

ОБОЗРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Физические основы криобиологии

А.И. Жмакин

Описаны физические явления на молекулярном, клеточном уровнях, на уровне тканей и органов в биологических объектах при замораживании и оттаивании. Рассмотрены основы криохирургических операций и криоконсервации клеток и тканей. Дан обзор моделей, включая численные, используемых в криобиологии.

PACS numbers: 44.05 + e, 81.10. – h, 87.15.Aa, 87.54.Br

DOI: 10.3367/UFNr.0178.200803b.0243

Содержание

1. Введение (243).
 2. Криовоздействие в биологии (245).
 - 2.1. Кристаллизация льда в биологической среде. 2.2. Эффекты криовоздействия.
 3. Криовоздействие *in silico* (256).
 - 3.1. Микроскопические модели. 3.2. Имитационные модели.
 - 3.3. Макроскопические модели.
 4. Заключение (261).
- Список литературы (261).

1. Введение

Когда физик обращается впервые к биологическим структурам и биологическим процессам, они ему представляются безнадежно сложными и запутанными. Но это — иллюзия.

С.Е. Бреслер [1]

Реакция биологических объектов — клеток, тканей, органов — на воздействие физических факторов различной природы (ультразвука [2, 3], электрического [4–7] или магнитного поля [8, 9], сверхвысокочастотного (СВЧ) электромагнитного поля [10–15], ионизирующего излучения [16], лазерного излучения [17–21], высокой или низкой температуры) представляет интерес с точки зрения оценки природных и техногенных воздействий на живой организм и использования в медицине для диагностики [22] и лечения. Биологический эффект бывает значительным и при слабом воздействии, играющем роль спускового механизма [9, 14].

Применение находят как полученная информация о процессах в тканях (например, понимание роли ионов

гидроксония H_3O^+ при облучении позволило предложить инъекции глюкозы для борьбы с опухолевыми клетками [16]), так и само воздействие электрического поля [6, 23, 24] или ультразвука [25–27] как средства ускорения доставки лекарственных препаратов. Использование физических факторов для уничтожения патологических тканей является неинвазивной альтернативой классической хирургии.

Часто совместно действует ряд факторов. Необратимая электропорация, основанная на разрушении клеточных мембран электрическими импульсами [28], сопровождается джоулевым нагревом тканей протекающим током [24]. СВЧ-излучение и ультразвук применяют для деструкции злокачественных тканей высокой температурой, однако электромагнитное поле непосредственно воздействует на конформации ДНК [29]; моделирование методом молекулярной динамики (МД) показывает, что поле вследствие переориентации дипольного момента белка приводит к изменениям его вторичной структуры и способствует денатурации [30]. В интенсивном звуковом поле наблюдаются нетермические эффекты: формирование вторичных течений в кровеносных сосудах и кавитация, связанная с присутствием в крови газовых пузырьков [31]; при этом возможно как механическое воздействие на клетки эндотелия, покрывающие стенки сосуда, за счет сдвиговых напряжений в потоке крови, так и активация процессов на уровне генов [32].

Криохирургия и криоконсервация. Воздействие низких температур используется для ликвидации патологической ткани [33–36] (криохирургия) и для подавления биохимических процессов¹ в клетках, в том числе стволовых [38], тканях или органах с последующей ревитализацией для трансплантации [35, 39–44], испытания лекарственных препаратов [45–47] и сохранения генетических ресурсов [48–50] (криоконсервация). Био-

А.И. Жмакин. Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН
 Политехническая ул. 26, 194021 Санкт-Петербург,
 Российская Федерация
 Тел. (812) 292-71-45. Факс (812) 297-10-17
 E-mail: ai@zhmakin.ru

Статья поступила 1 августа 2007 г.,
 после доработки 12 октября 2007 г.

¹ Иногда наблюдается повышение скорости биоорганических реакций при замораживании тканей, что приписывают росту концентрации растворов (freeze-concentration effect) и/или каталитическим свойствам льда, предположительно связанным с высокой подвижностью протонов в твердой фазе [37].

логические объекты хранятся при температуре жидкого азота, реже используются более высокие температуры [51]. На основании исследования образцов, хранившихся от 11 до 34 лет, срок годности консервированных эритроцитов оценивается в 113 и 276 лет при температурах -65 и -196 °С соответственно [52].

Термин "криохирургия" (*κρυο + χειρουργική*) неточен в своей второй части, ибо "работа руками" ограничена предварительной стадией операции — размещением криозондов. Википедия считает "криохирургию" и "криотерапию" синонимами (иногда их различают по минимальной температуре — выше или ниже температуры кристаллизации [53]). Операции на поверхностных тканях проводят распылением жидкого азота; простота этой процедуры делает ее доступной семейному врачу [54]. С историей криохирургии и криохирургических инструментов можно ознакомиться по работам [35, 55–57] и [57–59]; о развитии криохирургии в России см. [60]; опыты по замораживанию клеток проводятся с конца XVIII века [61]; о первой успешной криоконсервации сообщено в 1949 г. [62].

Искусственные ткани. Низкие температуры необходимы при создании искусственных тканей: пористая структура коллагеновой "губки" — заменителя кожи — получается высушиванием закристаллизованной суспензии белка коллагена и определяется морфологией дендритов льда [63].

Криофиксация. Быстрое замораживание используется (иногда при повышенном давлении [64]) для исследования биологических тканей с помощью низкотемпературного электронного микроскопа [65, 66] (замораживание — скалывание или замораживание — травление [67, 68]). Ключевая проблема электронной томографии заключается в сохранении структуры исследуемого объекта во время измерений [69]; погружение объекта в аморфный лед обеспечивает неизменность конформации и пространственного расположения макромолекул и элементов клеточной структуры. Исследование структуры белков и других макромолекул методами нейтронной кристаллографии [70, 71] или рентгеноструктурного анализа [72, 73] с использованием синхротронных источников [74] требует кристаллизации объекта исследования [75, 76]; качество кристалла, в том числе уровень мозаичности, определяет количество деталей, которые можно идентифицировать на карте электронной плотности [77]. При этом предполагается, что конформации молекул в растворе, когда они биологически активны, и в кристалле идентичны, ибо "некоторое число молекул воды встраивается в кристалл в процессе роста" и "кристалл при анализе находится в водной среде". Действительно, в кристалл встраивается значительное число молекул воды (от половины до двух в расчете на один аминокислотный остаток, т.е. около 200 для типичного белка [78], по другим оценкам — от 34 до 39 % по массе [79]). Часть из них, однако, встроена в структуры, сформированные в процессе роста кристалла [79]. Следует также заметить, что 1) для небольших белков 30–40 % площади, доступной растворителю в обычных условиях (SAS — solvent accessible surface), "спрятаны" внутри кристалла [80]; 2) в кристаллах белка не наблюдается холододенатурация — по-видимому, вследствие стабилизирующего эффекта ван-дер-ваальсовых сил и водородных связей

между молекулами в кристалле [79]; 3) рост кристаллов белков требует пересыщения раствора, на порядки превосходящего пересыщение при росте неорганических кристаллов [81], некоторые белки при этом образуют в растворе агрегаты (для этого, в отличие от нуклеации, нет энергетического барьера [82]), которые выступают в качестве "единиц роста" [83] (например, лисозим белка куриного яйца образует димеры, тетрамеры, октамеры и 16-меры), а уже формирование димера ведет к частичной денатурации белка, в частности к смещению гидрофобных групп на его поверхность [84].

Преимущество криоэлектронной микроскопии состоит также в возможности исследовать не только макромолекулы, но и гетерогенные структуры [85], например субклеточные (и даже субъядерные [86]) объекты в их взаимном расположении, соответствующем "живой" клетке. Критичным является быстрое охлаждение: в работе [87] на примере ряда растений показано, что в противном случае происходит перераспределение воды в тканях и образование депозитов льда во внеклеточном пространстве; иногда артефакты криофиксации более сложны для обнаружения, например шести- и семичленные кольцевые структуры воды в гидратационной оболочке белка, наблюдаемые при температурах ниже 200 К [80, 88].

Деструкция биологических тканей. При температурном воздействии, в отличие от радиационного [89–91], реакция тканей определяется тепловой историей: протяженность области затронутых органов изменяется за счет теплопроводности и переноса тепла кровью. Поведение тканей при криохирургии усложняется (в сравнении с гипертермией) зарождением и ростом кристаллов льда, рекристаллизацией льда при отогревании [92], изменением концентрации растворенных веществ в клетке и во внеклеточном пространстве, возникновением механических напряжений.

Можно выделить три этапа деструкции ткани. Во-первых, это разрушение клеток при замораживании вследствие образования кристаллов льда и механического воздействия на мембрану [93], увеличения их размера вследствие рекристаллизации [94, 95] при оттаивании (свободная энергия поверхности снижается с уменьшением ее кривизны) и/или из-за роста концентрации электролитов в клетке ("осмотический шок"). Во-вторых, нарушение микроциркуляции крови, проявляющееся через несколько часов/дней после операции. Наконец, вызванный охлаждением апоптоз² [102], существенный для периферийных областей ледяного шара [103]. Рассмотрение апоптоза, а также иммунной реакции организма на воздействие холода [104] выходит за рамки

² Причины гибели клетки имеют физическую (ионизирующее излучение, температура, механическое повреждение), химическую или биологическую природу [96]. Апоптоз — "нормальное" (программируемое) самоуничтожение клетки [97–99] отличается от некроза ("случайной" смерти клетки при воздействии физических или химических факторов) по морфологическим особенностям (например, деформация мембраны в первом случае и потеря ее целостности во втором) и по характеру биохимических реакций. Апоптоз инициируется внешними (по отношению к клетке) или внутренними процессами; в последнем случае посредниками в процессе выступают митохондрии [100]. Изменение температуры, в том числе холододовый шок, является одним из сигналов, который "включает" апоптоз [101].

настоящей работы. При криоконсервации следует избегать условий, способствующих деструкции.

Криовоздействие может сочетаться с традиционными процедурами (например, с иммунотерапией [104] или с химиотерапией [102, 105]) и с другими методами физического воздействия на ткани. Применение зондов-обогревателей [106] или лазера [20] расширяет возможности контроля зоны заморозки; этой же цели служат инъекции растворов с определенными теплофизическими свойствами [107, 108]; распыление криогенных жидкостей используется для защиты эпидермиса при лазерных операциях [109, 110]; использование импульсных лазеров в криоконсервации для увеличения скорости охлаждения предложено в работе [111]; СВЧ-нагрев при оттаивании законсервированных объектов [112, 113] повышает однородность поля температур и предотвращает рекристаллизацию льда. Использование СВЧ-излучения возможно и для воздействия на молекулярном уровне. Разрыв водородных связей препятствует нуклеации кристаллов льда, что снижает температуру кристаллизации [114]; в работе [115] этот механизм рассматривается как способ уменьшить количество связанной воды в клетках и повысить теплопроводность среды и эффективность криодеструкции; о значительном (в 2–3 раза) увеличении зоны некроза сообщается также в работе [16].

Криовоздействие принципиально отличается от гипертермического (ультразвукового [2, 117, 118], лазерного [18, 19, 119] или СВЧ [12, 13, 118, 120] нагрева). Последнее основано на объемном поглощении акустического или электромагнитного сигнала; охлаждение тканей возможно только через поверхность образца, поэтому неизбежна пространственная неоднородность температуры и скорости ее изменения в тканях, т.е. различная локальная тепловая история клеток. При моделировании гипертермии в уравнении энергии появляется источник тепла; описание криогенного воздействия содержится в граничных условиях. Цели математического моделирования — объяснить (в том числе используя информацию, которую нельзя получить экспериментально) и предсказать; последнее предполагает, что численные модели верифицированы [121, 122].

В настоящей работе описаны физические (в широком смысле, т.е. рассматривая химию как "отдел молекулярной физики" [1]) явления при замораживании и оттаивании биологических объектов, а также модели, используемые для изучения этих процессов. Основное внимание уделено исследованиям, выполненным в последние годы; работы, рассмотренные в доступных обзорах, за редкими исключениями, явно не цитируются.

2. Криовоздействие в биологии

Воздействие состоит из одного или, при криохирургии, нескольких циклов "замораживание – экспозиция – оттаивание" [33–35, 39, 123]. Интервал между циклами, позволяя развиваться нарушениям кровообращения, усиливает деструкцию [124]; возможно модулированное во времени воздействие ("динамическая" криохирургия) [125].

Перевод объекта в стеклообразное состояние без кристаллизации (витрификация) [46, 126–129] сверхбыстрым охлаждением определяется, прежде всего, скоростью процесса [46], поэтому ее легче осуществить для небольшого объекта; возможным примером этого про-

цесса в значительных масштабах служит предполагаемое переохлаждение полушария Европы, противоположного Юпитеру [130]. Витрификация биологических объектов обычно требует применения криопротекторов. Тип криопротектора, его концентрация, протоколы насыщения тканей и вывода криопротектора [39, 131] определяют исход криовоздействия.

Давно известны две фазы аморфного льда³ — низкой (ЛНП) и высокой (ЛВП) плотности [136]; дискутируется классификация льда "очень высокой плотности" (ЛОВП), получаемого из ЛВП при изобарическом нагреве при высоком давлении [137], как самостоятельной фазы [133, 138]. Все три фазы имеют тетраэдральную структуру сетки водородных связей, но ЛВП (ЛОВП) имеют одну (две) дополнительные молекулы между первой и второй оболочками соседей [137]. В вычислительных экспериментах обнаруживается существование еще одной (четвертой) фазы аморфного льда [139]. Недавние результаты указывают на то, что ЛВП — метастабильная фаза, а устойчивых фаз аморфного льда всего две — ЛНП и ЛОВП [140, 141]. Возможная пористость аморфного льда (и, как следствие, способность адсорбировать газы) принципиальна для объектов вне Земли — комет, спутников внешних планет, межзвездной пыли [142, 143]. Различные фазовые переходы в аморфный лед из пара, жидкости и гексагонального льда I_h , а также между аморфными фазами различной плотности рассмотрены в работах [133, 138]; заметим, что в эксперименте аморфный лед витрификацией воды получен на полвека позднее, чем осаждением из паровой фазы на холодную подложку при низком давлении методом, близким к современному методу молекулярно-пучковой эпитакии выращивания полупроводниковых гетероструктур.

2.1. Кристаллизация льда в биологической среде

Кристаллизация льда в биологических объектах существенно отличается от роста полупроводниковых кристаллов [144, 145].

Вода. Прежде всего отметим, что вода в жидкой и твердой фазе обладает рядом необычных свойств [146–150], список которых насчитывает более полусотни позиций [151], причем аномальность становится более выраженной для переохлажденной воды [138, 152, 153]; особые свойства вода имеет и в качестве растворителя, например зависимость подвижности растворенных ионов от радиуса немонотонна [154]. Особенности воды

³ Полиморфизм стеклообразного состояния ("полиаморфизм" [132]) наблюдается не только для воды, но и для ряда других веществ (Si, SiO₂, GeS₂) [133]. Различие между структурой кристаллического и аморфного льда проявляется в свойствах больших кластеров молекул воды. В работе [134] исследованы кластеры с числом молекул $n = 20–931$ (численно) и $n = 200–10^6$ (экспериментально). Для кластеров большого размера выделяется кристаллическое ядро, в то время как внешние слои неупорядочены вследствие реконструкции поверхности в стремлении увеличить число водородных связей; кластеры размером $n \leq 200$ и меньше слишком малы, чтобы поддерживать устойчивое кристаллическое ядро — спектры указывают на их аморфную структуру. Формальный анализ полиэдрических кластеров воды выполнен в работе [135]. Основываясь на "правилах", которые определяют возможное число связей между атомами кислорода и водорода, автор использовал методы теории графов для выявления структуры и общих свойств кластеров, организованных как многогранник.

связаны с наличием порядка в ее различных состояниях (кристаллах льда, жидкой воде, газовых клатратах⁴), который является следствием кооперативного эффекта структурно и динамически неоднородной сетки водородных связей [136, 150, 157, 158]. Термодинамические свойства воды определяются прежде всего статическими неоднородностями [140] — локальной структурой, а именно четырехкратной (в среднем расчеты с различными потенциалами взаимодействия показывают заметное число молекул с координационными числами от 3 до 6 [159]) координацией сетки — организацией молекул воды в виде тетраэдров [160, 161]. Тетраэдрический ближний порядок определяется sp^3 -гибридизацией электронных орбит [153]. Динамические неоднородности (трансляционные и вращательные) связывают с дефектами сетки водородных связей [162]. Структура сетки существенно меняется при наличии пространственных ограничений, например, для квазиодномерной воды в одностенной углеродной нанотрубке среднее координационное число меньше 2 [163]. Основой упорядочения в жидкой фазе являются подобные по строению льду I_h гексамеры воды $(H_2O)_6$, которые образуют ряд близких по энергии форм [164], в клатратах наблюдаются пентамеры $(H_2O)_5$, сгруппированные в додекаэдры. На основе элементарной ячейки из 14 молекул строится икосаэдрическая структура (280 молекул), которая может без разрыва водородных связей принимать одну из двух форм, отличающихся плотностью [165]. Сетка водородных связей служит основой ряда моделей: так, в [166] она рассматривается как совокупность "заполняющих пространство" (space-filling) кривых; в [157] температурная зависимость свойств воды представляется в виде разложения по структурным функциям, описывающим равновесную систему водородных связей (первая дает среднее число связей на молекулу, вторая описывает параметр "тетраэдричности" и т.д.).

Степень упорядоченности молекул воды увеличивается (уменьшается) при наличии космодропных (хаотропных) ионов. Характер воздействия ионов на структуру воды определяется их размером и знаком заряда и проявляется среди прочего в зависимости вязкости раствора η от концентрации c :

$$\frac{\eta(c)}{\eta_0} = 1 + A\sqrt{c} + Bc,$$

где коэффициент Джонса–Дойля B положителен для космодропов и отрицателен для хаотропов [167]. Об экспериментальном исследовании влияния взаимодействий с полярными, неполярными и заряженными молекулами на структуру воды см. [168]. Упорядоченность молекул воды увеличивает теплопроводность, приближая ее к теплопроводности льда [169]. *Транс*-конформация водородных связей благодаря дополнительному взаимодействию протонов и неподеленных электрон-

ных пар, не участвующих в образовании данной связи, оказывается прочнее, чем *цис*-конформация; как правило, две группы ОН одной молекулы воды задействованы в Н-связи разной силы [170]. О построении модели непрерывной сетки водородных связей с учетом сильных и слабых связей см. [171].

Наличие дальнего порядка в воде подтверждается видом радиальной (парной) функции распределения $g(\mathbf{r})$, определяемой в расчетах методом МД или экспериментально по рассеянию нейтронов или рентгеновских лучей [158]. Представляет интерес распределение атомов и межатомных (интерстициальных) пустот; *разностная* функция распределения

$$G(\mathbf{r}) = r^2 [g(\mathbf{r}) - 1]$$

визуализирует корреляции на больших расстояниях [172]. Ориентационно-корреляционная функция $g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2)$ [168] непосредственно не может быть определена по результатам измерений. Полная парная корреляционная функция $g(\mathbf{r}, \Omega_1, \Omega_2, \Omega_{12})$ включает полярные координаты вектора, соединяющего центры молекул [159]. В последней работе предложено для анализа координационных сфер строить корреляционные функции для сферических слоев $R_{\min} < r < R_{\max}$. Обзор структурных моделей воды как феноменологических, так и основанных на интегральных уравнениях для корреляционных функций типа Орнштейна – Цернике содержится в работе [153].

На основании расчетов высказана гипотеза о возможности при низких температурах фазового перехода первого рода жидкость–жидкость [160, 166, 173, 174], подобного переходу в аналогичном по структуре фосфоре [175], аморфизирующихся расплавах типа металл–металлоид (Ni–P, Fe–P, Ni–B), некоторых металлических сплавах (Ni–Zr) [176], предположительно, в растворах ряда макромолекул [177] и некоторых других жидкостях [178]. Этот переход совпадает с нарушением соотношения Стокса – Эйнштейна

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a},$$

где D — коэффициент диффузии, η — вязкость жидкости, a — гидродинамический радиус частицы [179]. Поскольку определение вязкости на основе МД-расчетов представляет серьезные трудности, авторы использовали время τ_z так называемой альфа-релаксации [180], которое зависит от температуры так же, как и η .

Поведение неупорядоченных сред при изменении температуры связывают с их способностью образовывать устойчивые структурные объекты с помощью направленных связей [176, 181]. Оказывается, однако, что направленный характер связей не является необходимым: многие аномалии воды воспроизводятся в предположении тетраэдральной (sp^3) координации с использованием сферически симметричного потенциала взаимодействия молекул со "смягченным" ядром (см. [182] и приведенную там литературу). Детальный анализ аномалий разной природы — структурных, термодинамических, динамических — проведен в [183]. Авторы использовали два параметра порядка: 1) трансляционный

$$\Omega_t \equiv \int_0^{s_c} |g(s) - 1| ds,$$

⁴ В клатратах (используются также термины "клатратные гидраты", "газовые гидраты") молекула газа окружена молекулами воды, образующими с помощью водородных связей устойчивую полость. Хорошо известен клатрат метана ("горючий" лед [155]), количество которого в морских глубинах по оценкам превосходит разведанные запасы углеводородных энергоносителей; он считается источником метана атмосферы Титана [156]; его структурные и электронные свойства, в том числе поведение водородных связей при изменении давления, исследованы в работе [155] методом функционала плотности.

где $s \equiv r\rho_n^{1/3}$ масштабируется по среднему расстоянию между частицами, $g(s)$ — парная корреляционная функция, а s_c — параметр обрезания (в работе был принят равным половине длины расчетной области); 2) ориентационный (связанный с частицей i)

$$\Omega_{li} \equiv \left[\frac{4\pi}{2l+1} \sum_{m=-l}^{m=l} |\bar{Y}_{lm}|^2 \right]^{1/2}.$$

Определение последнего основано на характеристике связи частицы с 12-ю ближайшими соседями двумя углами θ, ϕ , по которым вычисляется значение соответствующих сферических гармоник $Y_{lm}(\theta, \phi)$ и среднее \bar{Y}_{lm} . При $l = 6$ параметр Ω_{6i} служит мерой ориентационного порядка в системе частиц. Оказывается, что для появления аномальных структурных свойств принципиально наличие двух линейных масштабов в потенциале взаимодействия [183].

О проверке гипотезы о двух фазах воды сообщается в [184]. Используя дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) и нейтронную спектроскопию, авторы наблюдали два состояния переохлажденной воды, отличающиеся плотностью, и фазовый переход первого рода между ними. В экспериментах по динамике молекул воды в одностенной углеродной нанотрубке [185] при 228 К наблюдалась смена характера температурной зависимости времени релаксации от закона Фогеля–Фулчера–Тамманна

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{B}{T-T_0}\right)$$

[186] к зависимости аррениусовского типа

$$\tau = \tau_0 \exp\left(-\frac{E}{kT}\right),$$

E — энергия активации. Как полагают авторы, этот момент соответствует переходу от воды низкой плотности к воде высокой плотности. Аналогичные результаты по смене температурной зависимости времени релаксации были получены для воды в порах диаметром 50 нм в цеолите [187].

Температура гомогенной нуклеации чистой воды -39°C ; более глубокое переохлаждение (до -92°C [188]) достигается при высоком давлении и в нанопорах [189] (в то же время стеклообразное состояние воды в порах может существовать при комнатной температуре [190]); динамика воды, соответствующая жидкому состоянию, наблюдается при низких температурах в углеродных нанотрубках [163, 191]. Воздействие электрического поля напряженностью около 10^6 В м^{-1} на воду в нанометровом зазоре повышает температуру кристаллизации до комнатной [192]. Образованию льда способствуют ограничение подвижности молекул воды в нормальном к стенкам направлении и упорядочение диполей в поле, что облегчает формирование устойчивой сетки водородных связей; эффект обратим — понижение напряженности поля приводит к плавлению льда. Влияние поля на нуклеацию кристаллов льда известно около полутора веков [193]. Электрическое поле можно использовать для формирования зародышей льда в водном растворе при заданной температуре [194] с целью управления размером зерен в поликристалле или временем лиофилизации [195].

Биологическая вода. Поведение воды около гидрофобных или гидрофильных участков биологических молекул радикально отличается от ее поведения в объеме. Говорят о *связанной, упорядоченной* или *биологической* воде, в криобиологии ее называют незамерзающей (правильнее говорить о *незамерзшей* воде, допуская неравновесные состояния [196, 197]). Иногда выделяют *захороненную* [29, 198], или *внутреннюю* [80], воду, которая удерживается водородными связями во внутренних гидрофобных областях биологических молекул [199], образуя иногда кластеры [200]. Такая вода присутствует в большинстве глобулярных белков; несмотря на обмен с внешними молекулами с характерным временем от 10 нс до 1 мс [201], ее следует считать неотъемлемой частью белка [78, 80, 198]. Значение воды для устойчивости и функционирования биологических молекул [202] переоценить невозможно — ее называют 21-й аминокислотой [203]. В некоторых случаях для нормального поведения белка молекулы воды на его поверхности должны образовывать, в терминах теории протекания, кластер бесконечного размера [204, 205]. Аномальное поведение воды вблизи поверхности воспроизводится в МД-моделях (см. [206–209]).

Изменение свойств воды вблизи биологической поверхности вызвано перегруппировкой водородных связей — упорядочением молекул воды [210], что определяется как природой поверхности (полярная или неполярная), так и пространственными ограничениями на структуру сетки водородных связей (обрезание линейного масштаба корреляций [211]); существенно снижается подвижность молекул воды [212–216] и ее диэлектрическая постоянная [127, 128], увеличивается вязкость [219]. Влияние близости стенок на температуру кристаллизации известно из наблюдений за промерзанием грунтов [220, 221] и поведения воды в порах минералов [222]. Кристаллизация воды в узком (несколько диаметров молекулы воды) плоском зазоре исследовалась методом МД в работе [223] для случая инертной поверхности, с которой молекула воды не образует водородную связь. Изменение ширины зазора при комнатной температуре приводило к резкому (три-четыре порядка) изменению коэффициента диффузии, что интерпретировалось как переход в кристаллическое состояние, который авторы назвали "кристаллизация, вызванная ограничением" (confinement induced freezing). Авторы наблюдали две фазы жидкой воды в зазоре и отметили синергическое действие пространственных ограничений и электрического поля. Эффект потенциала взаимодействия молекул со стенкой изучался в работе [224] на примере зазора, содержащего два или три слоя молекул; рассмотрены потенциал Леннарда-Джонса и чисто отталкивающий потенциал. Повышение давления сдвигает молекулы воды в сторону гидрофобных поверхностей и увеличивает значение параметра тетраэдричности; для случая гидрофильных поверхностей влияние давления не обнаруживается [225].

Расчеты методом МД в рамках метода функционала плотности показывают наличие тонкого слоя воды повышенной плотности около гидрофильной поверхности [226] и существенное усиление связей молекул воды между собой в пределах первой гидратационной оболочки около неполярной поверхности в сравнении с молекулами, принадлежащими соседним оболочкам [227]. В работе [228] эволюция структуры воды на модельной

амфифильной поверхности (кремний, обработанный специальным образом) исследовалась с помощью метода сверхбыстрой электронной кристаллографии; показано, что характерные времена разрушения структуры, определяемой водородными связями, для поверхностного слоя воды и в объеме различаются на порядок. В то же время измерения вращательной подвижности молекул воды в гидратационной оболочке белка и в объеме методом дисперсии магнитной релаксации показывают всего лишь двукратное ее уменьшение [80].

Доказательства особых динамических свойств биологической воды получены в исследованиях воды, окружающей молекулу лактозы, с помощью абсорбционной спектроскопии в терагерцовом диапазоне (разрешение — доли пикосекунд) [217, 229] и воды на поверхности молекулы белка с фемтосекундным разрешением [230]; наблюдается также несколько слоев молекул воды у поверхности биологической мембраны, упорядоченных вследствие взаимодействия с головками липидных молекул [231]. Исследования динамики молекул воды в мицеллах показали отсутствие существенных отличий подвижности в ядре и значительное ее снижение в слое Штерна, включающем полярные группы амфифилов и противоионы [232]. На основании экспериментов и МД-расчетов предлагается различать три вида молекул воды: 1) молекулы, связанные только с другими молекулами воды (*свободная* вода); 2) молекулы, имеющие соответственно одну или 3) две водородные связи с полярными группами макромолекулы (*связанная* вода) [233].

Снижение подвижности молекул воды около поверхности качественно подобно поведению переохлажденной воды; в ряде случаев приводится даже значение "эквивалентного температурного сдвига": так, на основании расчетов методом МД значение этого параметра для воды в нанозазоре между двумя гладкими *гидрофобными* поверхностями оценивается как 40 К [211]. С другой стороны, моделирование для случая *гидрофильных* поверхностей гидроксида $Mg(OH)_2$ показывает, что эффект ограничения, скорее, аналогичен повышению давления [234]. При понижении температуры так же, как в упомянутых выше экспериментах с нанотрубками [185], наблюдается смена температурной зависимости времени релаксации примерно в том же диапазоне температур (222 и 220 К для воды на поверхности ДНК и лисозима соответственно [235]).

Расхождения в данных по динамическим свойствам биологической воды, полученных разными способами, объясняются трудностью разделения эффектов движения молекул воды и макромолекул в некоторых экспериментальных методах [80]; в этой работе отмечается, что снижение подвижности макромолекул в растворе в сравнении с подвижностью эквивалентного (в гидродинамическом смысле) тела (сферы, эллипсоида вращения) связано также со значительной нерегулярностью поверхности.

Наконец, биологическая среда характеризуется сложной микроструктурой; в отсутствие "затравочной" поверхности образование льда в переохлажденном растворе инициируется нуклеацией: гомогенной [236] или гетерогенной. Гетерогенная нуклеация доминирует, если справедливо неравенство ("критерий смачиваемости") $\sigma^{vs} - \sigma^{vl} < \sigma^{ls}$, где σ^{ij} — поверхностное натяжение на границе фаз i и j , индексы v , l и s обозначают пар, жидкость и твердую фазу [237]. Нуклеация наблюдается

на мембране клетки [238] или на объектах, содержащихся в цитоплазме, причем вклад нуклеации на субклеточных объектах возрастает при понижении температуры [239]; в клетках некоторых древесных растений гетерогенная нуклеация не отмечена [240] и возможно сосуществование льда и переохлажденной воды [241]. Фазовый переход при охлаждении биологической среды происходит в некотором диапазоне температур [242, 243] (в этом отношении биологические ткани не уникальны — так же происходит, например, промерзание грунтов [221, 244]).

2.2. Эффекты криовоздействия

Степень повреждения клетки определяется скоростями замораживания и оттаивания, длительностью экспозиции, окружением (изолированная клетка; плотноупакованный ансамбль клеток в образце ткани — *in vitro*; клетки в живом организме — *in vivo*).

2.2.1. Процессы в клетках при гипотермии. Нормальная температура теплокровных организмов (и даже некоторых холоднокровных за счет поведенческой терморегуляции) находится в диапазоне 35–42 °С, а стабильность температуры головного мозга человека составляет около одной десятой градуса [245], некоторые организмы погибают от переохлаждения до наступления замерзания [246]. Многие типы клеток, однако, удолетворительно переносят охлаждение до температур выше точки замерзания (например, эритроциты — до полутора месяцев [247]). В природе наблюдаются две стратегии адаптации организма при охлаждении [248–250]:

1) предотвращение кристаллизации: аккумулярование в период акклиматизации [251] олигосахаридов [252, 253], других растворимых углеводов [254], глицерина [255], свободных аминокислот [240], препятствующих нуклеации льда [256]; этому способствуют также белки-антифризы (antifreeze proteins (AFPs)), "белки теплового гистерезиса" (thermal hysteresis proteins (THPs)), которые, снижая температуру кристаллизации раствора, оставляют неизменной температуру плавления [257]; амплитуда гистерезиса зависит от концентрации AFP [258] (о молекулярных и генных процессах адаптации психрофильных организмов к холоду см. [259, 260]);

2) управление кристаллизацией во времени (точнее, в температурном диапазоне, например, минимизация переохлаждения ΔT и тем самым ограничение скорости нуклеации $J \propto \exp(B\tau)$, где $\tau \propto (\Delta T)^{-2}$ [238]) и в пространстве (образование льда вне клеток): модификация процесса образования льда с помощью "нуклеаторов" — белков, которые облегчают формирование зародышей критического размера⁵ при требуемой температуре (как правило, выше -10°C [262]) и в тех отделах организма, где присутствие льда переносимо (внеклеточное пространство — именно там обнаружены белки-нуклеаторы в живых организмах); контролируемый рост льда позволяет, в частности, обеспечить дегидратацию жизненно

⁵ Известна эффективность органических молекул, имеющих характерный линейный размер структуры порядка постоянной решетки льда, как ядер кристаллизации для роста льда из газовой фазы; например, монослой $C_nH_{2n+1}OH$ повышает температуру нуклеации до -8°C для четного $n \geq 22$ и до -1°C для $n = 31$; размер критического зародыша оказывается всего около 20 Å, что соответствует примерно 50 молекулам воды и сравнимо с размером критического зародыша гомогенной нуклеации при температуре -39°C [261].

важных органов [255] и предотвратить их повреждение; в организмах этой группы находят и белки-антифризы, назначение которых — препятствовать рекристаллизации [263].

Наблюдается также смена стратегии в зависимости от состояния окружающей среды [264]; примером использования обеих стратегий служит ящерица *Lacerta vivipara* [265].

Некоторые животные восстанавливают все функции после длительного замораживания около 50 % (согласно работе [266] до 70 %) по массе воды в организме (например, древесная лягушка *Rana sylvatica* — 65 % на срок до двух недель) [253, 267, 268]; известны организмы, переносящие образование внутриклеточного льда [269], насекомые (понижение температуры до -70°C [249]), ряд древесных растений (до -50°C [252, 270]), беспозвоночные и семена в высушенном состоянии (до температур, близких к абсолютному нулю [271]).

Понижение температуры инициирует синтез "белков теплового шока" (heat shock proteins, иногда используют термины heat stress proteins [272] и cold shock proteins [256]) [274, 275, 277, 278], которые способствуют поддержанию гомеостаза клетки, например, компенсируют снижение скорости метаболических реакций [240]. Название неудачно и отражает историю открытия этих белков: в действительности они синтезируются как реакция на физиологический стресс различной природы: нагрев, охлаждение, аноксия, ишемия, присутствие токсичных веществ; универсальность этих белков проявляется и в том, что они экспрессируются во всех живых организмах — от бактерии до человека [273, 274]. Возражение [275] против более точного термина "стрессовые" белки (стресс-белки) [257] — эти белки синтезируются и в нормальных условиях — в той же мере применимо к термину "белки теплового шока". О специфической и неспецифической реакции на молекулярном и клеточном уровнях растительных клеток на холод, недостаток влаги и повышенную соленость см. [276]. Заметим, что неспецифическая реакция на различные воздействия на уровне организма описывается известной теорией общего адаптационного синдрома Г. Селье.

Тем не менее охлаждение способно привести к гибели клетки [34, 279]: меняется третичная структура белка, возможны нарушения в составляющих белки полипептидах и денатурация белка [257, 280]. Устойчивость нативной конформации определяется разницей значений свободной энергии Гиббса нативного и денатурированного состояний [281], которая как функция температуры имеет параболическую форму с максимумом в области $15-25^{\circ}\text{C}$ [282]; существенную роль в процессе денатурации играет наличие сетки водородных связей в системе молекул воды, взаимодействующих с белком [203] (подробнее об устойчивости белка см. обзор [238]).

Денатурация белка. "Холодовая" денатурация белка (нарушение вторичной структуры, определяемой главным образом водородными связями [284]), наблюдаемая при температурах $0-20^{\circ}\text{C}$ [285], бывает как обратимой, так и необратимой, в отличие от обычно необратимой тепловой денатурации [278]. Процесс рассматривается как резкий кооперативный переход [286] (переход типа "все или ничего" [287]). Это не вполне строго (о промежуточных состояниях белка см. обзор [288]), но одностадийная модель, описываемая необратимой реакцией

первого порядка $N \xrightarrow{k} D$, где N и D — нативный и денатурированный белки, является хорошим приближением для многих задач. Доля денатурированного белка

$$F_d = 1 - \exp\left(-\int_0^t k dt\right),$$

где зависимость скорости реакции от температуры следует модели Аррениуса

$$k(T) = A \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right),$$

ΔE — энергия активации. Целесообразность использования кинетических моделей повышенного порядка, в которые явно вводятся в рассмотрение промежуточные состояния белка между нативным и денатурированным [278], несомненна, если различаются состояния белка после (обратимого) разворачивания U и конечное (необратимое) денатурированное состояние, возникшее в результате агрегации, химической модификации аминокислотных остатков или по иным причинам [289]. Процесс описывается как двустадийный (модель Ламри — Эйринга) $N \rightleftharpoons U \rightarrow D$. Более сложные модели денатурации белков рассмотрены в цитированной выше работе. Денатурированное состояние белка может быть неединственным [288].

Поведение мембраны. Клеточная мембрана представляет собой двойной слой амфифильных (имеющих гидрофобные и гидрофильные участки) молекул — липидов, которые делятся на три группы: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды; мембрана содержит до сотни разных типов липидных молекул [68] и белки — периферические и интегральные. Мембранные липиды имеют небольшую полярную головку и длинный неполярный (углеводородный) хвост. Определяющим для структуры, устойчивости и свойств мембран является взаимодействие составляющих ее молекул с водой; часть воды — гидратные оболочки вокруг полярных частей молекул липидов и белков, одиночные молекулы воды в углеводородной зоне мембран — осмотически неактивна. Поверхность многих мембран заряжена (в среднем) отрицательно [290]. В зависимости от содержания воды в системе и концентрации электролитов [291] реализуются различные мезофазы; биологическая мембрана в нормальном состоянии является лиотропным жидким кристаллом [292].

Классическая жидкостно-мозаичная модель [293] предполагает наличие одного вида липидной молекулы; обобщение на случай двух различных липидов [294–296] заметно расширяет круг задач, допускающих строгое рассмотрение; в частности, становится возможным корректное описание деформации мембраны [296] и разделения фаз [295, 297]. Гетерогенность и динамический характер мембранной структуры существенны для ее функционирования [272]. Мембрана реагирует на изменение температуры (термотропный мезоморфизм [68]): при нагреве в билипидном слое образуются гексагональные структуры, при охлаждении составляющие мембрану липиды переходят в гелеобразную фазу (переход "жидкое — твердое", *главный фазовый переход* [245]). Переход в гель сопровождается резким изменением размеров [298], возникновением дефектов между мембранными белками и липидным слоем [299, 300], увеличением

проницаемости мембраны для ионов [301]. Критическая температура перехода зависит от содержания воды в системе и достигает минимума, как только оно превышает то количество воды, которое способны связать липидные структуры [68], а также от состава мембраны (соотношения насыщенных и ненасыщенных фосфолипидов; известный пример — изменение доли ненасыщенных липидов в клетках ноги северного оленя от копыта к туловищу в соответствии с изменением — на десятки градусов — характерной температуры). При охлаждении снижаются потенциал мышечных мембран и возбудимость мышечных волокон, что связывают с нарушением целостности мембран [257] и изменением состава (преимущественное удаление гидрофильных липидных компонентов [302]). Фрагментации мембраны может предшествовать потеря содержащихся в ней белков [240]. Снижение механической прочности мембран подтверждается экспериментами по центрифугированию охлажденных клеток [303]. Понижение температуры приводит к деполимеризации цитоскелета [51], снижает способность интегральных белков [304] регулировать концентрацию электролитов в клетке, что также может вызвать денатурацию белка.

2.2.2. Воздействие на клетки в водных растворах. Особенности поведения изолированной клетки при замораживании в зависимости от скорости охлаждения (см., например, [39, 40, 305, 305]) объясняются в рамках модели "мешка с соленой водой". Процесс начинается с кристаллизации переохлажденного раствора, что ведет к росту его концентрации. Скорость нуклеации сначала растет с увеличением степени переохлаждения, затем достигает максимума и начинает падать из-за снижения подвижности молекул [238]. При росте поликристалла различают первичную и вторичную нуклеацию, понимая под последней процессы на границах существующих зерен [307]. Морфология растущего кристалла (в том числе в случае роста дендритов — фрактальная размерность) определяется, прежде всего, степенью переохлаждения [303, 308].

Дегидратация клетки. При медленном замораживании разрушение клетки вызывается дегидратацией (вода покидает клетку как посредством диффузии через мембрану, так и через поры в последней [309]), приводящей к росту концентрации растворенных веществ в клетке и ее сжатию. В приближении идеального раствора (разница химических потенциалов цитоплазмы и воды пропорциональна $\ln(1 - \chi)$, где χ — молярная доля растворенных веществ) снижение температуры кристаллизации $\Delta T \propto \chi$ [310]. Этот эффект коллигативный, т.е. определяется количеством растворенных веществ, но не их природой; дополнительный эффект в случае макромолекул связан со свойствами их поверхности [196]. Заметим, что влияние растворенных веществ на структуру сетки водородных связей и температуру кристаллизации во многом аналогично действию повышенного давления [311]. Предотвращение образования льда в клетке играет защитную роль [252], однако рост концентрации ведет к "осмотическому" шоку: денатурации белка, лизису мембраны, повреждению ядра, митохондрий [35, 312]. Поведение мембраны чувствительно к температуре, при которой начинается кристаллизация раствора [285].

Двухкамерная модель дегидратации и сжатия клетки (точнее, изменения ее объема) в замораживающем растворе [313], предложенная более 40 лет назад, остается основой большинства современных моделей. Она основана на выведенных из принципов линейной термодинамики необратимых процессов уравнениях Кедема–Качальского для переноса неэлектролита через проницаемую мембрану, разделяющую хорошо перемешанные идеальные разбавленные растворы [314]:

$$J_v = L_p \Delta P - L_p \sigma \Delta \Pi, \quad j_s = \omega \Delta \Pi + (1 - \sigma) \bar{c} J_v,$$

где J_v — объемный поток, j_s — поток растворенного вещества, L_p — гидравлическая проницаемость (коэффициент фильтрации), σ и ω — коэффициенты отражения и проницаемости, ΔP и $\Delta \Pi$ — перепады гидравлического и осмотического давления на мембране, \bar{c} — средняя концентрация. "Механистический" вывод уравнений переноса через мембрану, предложенный в [315, 316], дает простую трактовку входящих в уравнения коэффициентов; в цитированных работах также рассмотрены мембраны, имеющие поры разного радиуса.

Осмотический транспорт воды из клетки [317] лимитируется проницаемостью мембраны, которая зависит от температуры:

$$L_p = L_{p0} \exp \left[- \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right],$$

и является единственным параметром модели, E_a — энергия активации. Распространение модели на случай присутствия в растворе криопротектора, способного проникать в клетку [39, 318], добавляет проницаемость мембраны для криопротектора и параметр, описывающий взаимодействие растворенного вещества с молекулами воды. Обобщение модели на случай неидеальных концентрированных растворов рассмотрено в [319]. Наиболее полная формулировка задачи для клетки в многокомпонентном растворе, приведенная в [320], учитывает эффекты напряжения мембраны и отличие коэффициентов распределения растворенных веществ от единицы. Учет напряжения проводится в предположении сферичности клетки и порогового характера реакции мембраны (поверхностное напряжение полагается нулевым при площади поверхности мембраны меньше некоторого заданного значения).

Случай клетки произвольной формы рассмотрен в [317]. Хотя гидродинамическая скорость цитоплазмы, в отличие от сферической клетки, не является нулевой, ее масштаб определяется скоростью движения мембраны и квазистационарный анализ по-прежнему справедлив; решение уравнений в общем случае возможно численно; авторы сообщают о приближенных результатах, полученных для практически важного случая клетки цилиндрической формы.

В описанной нуль-мерной модели пренебрегается процессами диффузии в цитоплазме клетки. Это допущение справедливо, например, для лейкоцитов и лимфоцитов, но нарушается для эритроцитов [321]. Одномерная модель [322], включающая диффузию, позволила дифференцировать режимы дегидратации на лимитированные мембранным переносом и лимитированные диффузией внутри клетки.

Внутриклеточный лед. При быстром охлаждении вода не успевает покинуть клетку и причиной деструкции

является внутриклеточный лед [323], нарушающий целостность мембраны и цитоскелета [324] (подробнее о механических повреждениях клетки см. [325]).

Вероятность спонтанной нуклеации зависит от объема цитоплазмы, степени переохлаждения, концентрации растворенных веществ, вязкости жидкости. Связь температуры образования внутриклеточного льда с долей незамерзающей воды экспериментально исследована в работе [323]. Термодинамическая модель образования внутриклеточного льда с учетом гетерогенной нуклеации на клеточной мембране и на частицах, содержащихся в цитоплазме, разработана в работе [326]. Основываясь на классической теории нуклеации⁶ как последовательности бимолекулярных реакций $\alpha + \beta_m \rightleftharpoons \beta_{m+1}$, авторы нашли скорость гомогенной нуклеации I^s как функцию двух параметров — термодинамического Ω и кинетического \varkappa :

$$I^s = \Omega \exp\left(-\frac{\varkappa}{\Delta T^2 T^3}\right),$$

где

$$\Omega = 2(v^\beta)^{1/3} \frac{(\sigma^{\alpha\beta} kT)^{1/2}}{\eta v^\alpha N_v}, \quad \varkappa = \frac{16\pi(\sigma^{\alpha\beta})^3 T_f^4}{3kL^2}, \quad (1)$$

ΔT — переохлаждение, v^α — молекулярный объем фазы α , $\sigma^{\alpha\beta}$ — свободная энергия границы лед–вода, L — теплота кристаллизации, η — вязкость цитоплазмы. Последняя аппроксимируется как

$$\frac{\eta}{\eta_w} = \exp\left(\frac{5}{2} \frac{\phi_m}{1 - Q\phi_m}\right),$$

где η_w — вязкость чистой воды, ϕ_m — суммарная объемная доля растворенных веществ (например, солей и белков), Q — параметр взаимодействия; для температурной зависимости вязкости используются форма Фогеля–Фуллера

$$\eta \propto \exp\left(\frac{E}{T - T_0}\right)$$

или степенная аппроксимация. Авторами [326] предложена также модификация параметров Ω и \varkappa для случая гетерогенной нуклеации, которая сводится к появлению в уравнениях (1) множителей $(f(\theta_0))^{1/6}$ и $f(\theta_0)$ соответственно, $f(\theta) = (1 - \cos\theta)^2(2 + \cos\theta)/4$, а θ_0 — контактный угол между ледяным кластером и внутренней поверхностью мембраны, который изменяется линейно в зависимости от концентрации раствора. Предложенная модель наиболее чувствительна к значениям \varkappa и η .

⁶ В этой теории скорость нуклеации $J = J_0 \exp(-W^*/kT)$, где префактор J_0 связан с молекулярной подвижностью, а избыточная свободная энергия критического кластера W^* вычисляется в предположении сферичности последнего и постоянства плотности ("капельная" модель — энергия представляется как $E = -4/3\pi R^3 \Delta F + 4\pi R^2 \sigma^{\alpha\beta}$, где ΔF — разница свободной энергии фаз на единицу объема и $\sigma^{\alpha\beta}$ — удельная поверхностная энергия). Точность анализа снижается в случае очень малых критических зародышей и полярных молекул. Более строгая модель, основанная на методе функционала плотности, учитывает распределение плотности по радиусу $\rho(r)$ [236].

Позднее она была сопряжена с моделью транспорта воды через мембрану [327] и использована для смеси вода–NaCl–глицерин.

В конце замораживания кристаллы льда могут быть настолько мелкими, что клеточные органеллы остаются неповрежденными, однако рекристаллизация при оттаивании приводит к губительному увеличению размера кристаллов [328]. При понижении температуры падает эффективность активного транспорта ионов через мембрану, основанного на метаболических реакциях [329]. Клетка повреждается и при эвтектической кристаллизации [330]. Роль осмотического шока исследована в [303, 331] имитацией эволюции окружения клетки при замораживании: повышение концентрации раствора ("кристаллизация раствора"), затем разбавление ("отогревание"). Замена NaCl солью лития, обладающей более сильным лиотропным эффектом, приводит к более серьезным повреждениям клетки [303]. Менее изучено противодействие клетки изменениям ее объема и состава цитоплазмы на молекулярном уровне, которое проявляется, например, в активации ионных каналов, транспортных механизмов или регуляции синтеза белков [44, 276].

Существует оптимальное для выживания клетки значение скорости охлаждения [332]. Это значение определяется соотношением характерного времени отвода тепла, выделяющегося при кристаллизации льда, и характерного времени диффузии воды через мембрану, поэтому наиболее важными параметрами клетки являются ее размер (или отношение объема к поверхности для клеток, форма которых далека от сферической) и гидравлическая проводимость мембраны [333]. Так, для эритроцитов, имеющих дискообразную форму и высокую проницаемость мембраны, оптимальная скорость охлаждения выше (до 10^3 раз [111]), чем для клеток других типов. Клетки отличаются также чувствительностью к скорости оттаивания [334], причем зависимость более сильная в присутствии криопротектора [335]; быстрое оттаивание предпочтительно.

Криопротекторы. Оптимальная скорость охлаждения при криоконсервации модифицируется с помощью криопротекторов [33, 128, 247, 336–338], которые делятся на две группы в зависимости от того, проникают ли они в клетку или нет. Первые (интрацеллюлярные (эндоцеллюлярные) [339]) снижают концентрацию электролитов и препятствуют уменьшению объема клеток в гипертоническом растворе. Экстрацеллюлярные (экзоцеллюлярные) криопротекторы активизируют потерю воды клетками, снижая вероятность образования внутриклеточного льда при высокой скорости охлаждения. Криопротекторы (глицерин, сахароза) предотвращают частичную денатурацию белков в замерзающем растворе [340], препятствуют эвтектической кристаллизации [330]. Криопротекторами служат как низкомолекулярные вещества (диметилсульфоксид $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (ДМСО), глицерин, дисахариды и др.), так и высокомолекулярные полимеры [129]; кроме того, в качестве модификаторов криовоздействия используются металлические наночастицы [341]. Один из параметров, определяющих эффективность криопротектора, — количество воды, которую он может связать [342].

Молекулы криопротекторов взаимодействуют с мембранами уже при комнатной температуре, меняя конфор-

мационное состояние интегрального белка в липидном бислое [343]. Присутствие криопротектора снижает текучесть мембраны [344] и температуру главного фазового перехода [254, 345], температуру перехода от ламеллярной жидкокристаллической фазы к обращенной гексагональной [346], меняет гидравлическую проводимость мембраны [347] и ее температурную зависимость (энергию активации) [61, 348, 349], теплофизические свойства раствора [350] (в том числе понижает температуру кристаллизации [351]), морфологию растущих кристаллов: так, увеличение концентрации ДМСО способствует росту вторичных дендритов [352]; в присутствии криопротекторов понижается температура, при которой регистрируется формирование внутриклеточного льда [353].

Олигосахариды и другие низкомолекулярные вещества препятствуют чрезмерному сближению мембран при сильной дегидратации, что задерживает их переход из жидкой фазы в гель [254]. Влияние природы криопротектора (ДМСО, сорбитол, сахароза, трегалоза) на замерзание ламеллярной фазы [354] модельной липидной мембраны исследовано методом ядерного магнитного резонанса, который позволяет найти долю незамерзшей воды, в работе [355]; в качестве растворителя использовалась тяжелая вода D_2O . Показано, что все рассмотренные вещества усиливают гидратацию ламеллярной фазы, однако в случае низкой концентрации сахарозы и трегалозы доминирующим оказывается чисто осмотический эффект. В предложенной авторами термодинамической модели рассмотренной системы пренебрегается размерами молекул воды и криопротектора по сравнению с расстоянием между липидными слоями.

Белки-антифризы [37, 258, 356–359] проявляют свое присутствие двояко: с одной стороны, подавляют рост льда и его рекристаллизацию при оттаивании [250, 360–364]. Молекулы белка-антифриза встраиваются в ступени роста на поверхности кристалла льда, разбивая фронт кристаллизации на множество участков; увеличение кривизны фронта приводит к росту поверхностной свободной энергии и торможению фронта; во взаимодействии со льдом участвует значительная часть поверхности белка [258]. Исследование с помощью сканирующего туннельного микроскопа показывает систему канавок — мест адсорбции белка, глубина которых (2–10 нм) позволяет судить о кривизне фронта кристаллизации [363]. Кроме того, из МД-расчетов следует, что присутствие белка-антифриза повышает энергетический барьер гомогенной нуклеации [364]. С другой стороны, эти белки изменяют морфологию кристаллов экстрацеллюлярного льда, способствуя деструкции клетки [365]. Последнее свойство используется в криохирургии [366]: при достаточно высокой концентрации антифриза кристаллы принимают иглообразную (бипирамидальную) форму и механически разрушают клеточную мембрану [34, 270]. Кристаллы, образованные двумя полыми шестигранными пирамидами, формируются также в чистой воде, если переохлаждение превышает $2,7^\circ C$ [367]. Температура фазовой границы T_1 вода–лед представляется как

$$T_1 = T_m [1 - d_1(\theta, \phi) k_1 - d_2(\theta, \phi) k_2 - \beta(\theta, \phi, V_n)],$$

где T_m — температура плавления, θ, ϕ — ориентация границы по отношению к двум ортогональным осям,

d_1, d_2 и k_1, k_2 — соответствующие значения капиллярной длины и кривизны интерфейса, V_n — нормальная скорость последнего. Кинетическое переохлаждение $\beta(\theta, \phi, V_n)$ описывает отклонение от равновесия для заданных ориентации и нормальной скорости. Изменение морфологии фронта кристаллизации определяется зависимостью поверхностного натяжения и кинетического коэффициента переохлаждения от кристаллографической ориентации поверхности. Более сложные структуры наблюдаются при переохлаждении, превышающем $5,5^\circ C$.

Взаимодействие клеток с фронтом кристаллизации. Повреждение клеток в замерзающем растворе имеет механический характер и при их попадании в каналы между растущими в виде "пальцев" кристаллами льда [40]. Фронт кристаллизации, распространяющийся в переохлажденном растворе, неустойчив [368]; исследование этой неустойчивости в присутствии клеток, которые моделируются как жесткие сферические частицы, проведено в [369]. Объемная доля частиц в растворе ϕ описывается в системе координат, связанной с фронтом, уравнением сохранения массы

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} - V \frac{\partial \phi}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial z} D(\phi) \frac{\partial \phi}{\partial z},$$

где V — скорость фронта кристаллизации, коэффициент диффузии $D(\phi) = D_0 \hat{D}(\phi)$, $D_0 = kT/6\pi R\mu$, R — радиус частицы, μ — динамическая вязкость жидкости, $\hat{D}(\phi) = (1 - \phi)^6 d(\phi Z)/d\phi$, параметр сжимаемости для модели жестких сфер $Z(\phi)$ — рациональная функция четвертого порядка [369]. Диффузией частиц в твердой фазе пренебрегается, условие сохранения массы на фронте имеет вид $(\phi_1 - \phi_s) V_n = -D(\phi_1) \nabla \phi_1 \mathbf{n}$, V_n — нормальная скорость фронта, а концентрации в растворе ϕ_1 и в твердой фазе ϕ_s связаны коэффициентом распределения k_s : $\phi_s = k_s \phi_1$. Линейный анализ устойчивости показывает, что увеличение размера частицы стабилизирует фронт, а рост концентрации усиливает неустойчивость.

Поведение клеток относительно фронта кристаллизации определяется скоростью последнего (клетки отторгаются от межфазной границы, если скорость больше пороговой V_c , и захватываются льдом в противном случае [370]). Помимо размера частицы, в задаче имеется два линейных масштаба [371]. Первый $\Gamma = T_m \sigma^{s1} / \rho_s L R G$ (σ^{s1} — поверхностная энергия, ρ_s — плотность твердой фазы, R — радиус частицы, G — градиент температуры) определяет эффект кривизны фронта, второй связан с масштабом λ и с характером молекулярных взаимодействий: $\lambda = (\lambda^v T_m / G)^{1/(v+1)}$ ($v = 3$ для ван-дер-ваальсовых сил, $v = 2$ для электростатического взаимодействия). Критический радиус R_c определяется условием $\Gamma = \lambda$. Для больших частиц ($R \gg R_c$) возможно аналитическое решение $V_c \propto R^{-1}$ и $V_c \propto G^{1/4}$ для ван-дер-ваальсовых сил; в противоположном случае ($R \ll R_c$) V_c не зависит от градиента температуры и $V_c \propto R^{-4/3}$ [371].

Дальнейшее увеличение скорости охлаждения вновь повышает выживаемость клеток. Так, в [372], где этот параметр варьировался в пределах от 5 до $30\,000^\circ C \text{ мин}^{-1}$, доля сохранившихся после замораживания клеток монотонно возрастала начиная с $5\,000^\circ C \text{ мин}^{-1}$. Авторы полагают, что возможны два

объяснения: 1) образование в клетке мелких кристаллов льда (характерный размер уменьшается с увеличением скорости охлаждения [373]), которые не повреждают мембрану; 2) витрификация.

Витрификация осуществляется, во-первых, сверхбыстрым охлаждением (для объемов около нанолитра с использованием переохлажденного до -200°C жидкого азота достигнута скорость охлаждения $130\,000^{\circ}\text{C}\text{ мин}^{-1}$ [374]; расчеты показывают возможность превысить $300\,000^{\circ}\text{C}\text{ мин}^{-1}$ с помощью специальных систем охлаждения, максимизирующих коэффициент теплопередачи [375]) и/или, во-вторых, использованием концентрированных (до 50 % по массе) растворов криопротекторов [127, 128]. В последнем случае в образце могут присутствовать одновременно области кристаллического и аморфного льда [376]. Один из эффектов высокой концентрации криопротекторов в растворе — увеличение его вязкости, что способствует переходу в стеклообразное состояние [377].

К недостаткам криопротекторов следует отнести их высокую токсичность [378], которая проявляется у пациента после трансплантации [379], и сложность насыщения тканей в криохирургии и при криоконсервации объектов большого размера (техника микроинъекций [362] лишь смягчает последнюю проблему). Токсичность имеет химическую или осмотическую природу [46]; кроме того, интрацеллюлярные криопротекторы могут непосредственно воздействовать на внутриклеточные органеллы [44]. Токсичность последних определяется, в первую очередь, силой водородной связи полярной части криопротектора с водой [380]. Снижение токсичности состоит в минимизации возмущения цитоплазмы использованием смесей криопротекторов [380–382], в том числе добавлением трегалозы или глюкозы в растворы высокой концентрации [381, 383] или предварительным насыщением тканей в растворе этиленгликоля [129].

Влияние вида криопротектора на формирование аморфного льда и его устойчивость рассмотрено в работе [384] на примере эритроцитов. Основным параметром, определяющим поведение витрифицированного образца при хранении, является температура стеклования: выше этого порога — жидкость в метастабильном состоянии с чрезвычайно высокой вязкостью, ниже — аморфное твердое тело. Сравнение различных моделей для определения температуры стеклования выполнено в работе [385] на примере смеси вода–трегалоза. Отмечено, в частности, что общий подход к определению параметра смеси Y_{mix} по значениям для компонент Y_i как средневзвешенного: $Y_{\text{mix}} = (\sum Y_i f_i) / (\sum f_i)$, где f_i — доли фракций в необходимых единицах (молярные, массовые или объемные), в этом случае неприменим; рассмотрены модели Кочмана–Караса и Гордона–Тэйлора для бинарных растворов и их обобщение на случай смеси криопротекторов близкой химической природы (например, низкомолекулярных углеводов). Ранее температура стеклования воды принималась равной 136 К, однако последние исследования дают более высокие значения (от 145 К [190] до 160 К [386]–165 К [387]). Оттаивание должно проводиться так, чтобы избежать девитрификации [388] — нуклеации и роста кристаллов льда. В концентрированных растворах наблюдается нуклеация не только гексагонального льда I_h , но и кубического I_c [389]. Нуклеация в водных растворах этиленгликоля исследована в [390] на основе модели

Джонсона–Мела–Аврами–Колмогорова, в рамках которой изменение доли кристаллизовавшегося льда x во времени описывается как $x = 1 - \exp[-(Kt)^n]$, где параметр n зависит от морфологии кристалла. В работе для константы реакции предложено выражение $K \propto D(T) N^{2/3}$, где $D(T)$ — коэффициент диффузии молекул воды при температуре T , N — плотность ядер кристаллизации.

Криомикроскоп [391] позволяет наблюдать образование внутриклеточного льда, деформацию клеток при дегидратации и взаимодействии с кристаллами льда и другие описанные явления [93, 392].

2.2.3. Криовоздействие *in vitro*. Хотя расстояние между клетками в тканях значительно меньше, чем в растворе, процессы замораживания в них во многом похожи [34]; основные отличия суть большая устойчивость к дегидратации плотноупакованных клеток в сравнении с клетками в суспензии [393] и влияние контакта клеток на распространение внутриклеточного льда. Последний вопрос изучался в работах [394–398]. В частности, возможность распространения ледяного фронта через поры мембран доказана экспериментально. Этот результат подтверждается в работе [399] регулярностью временной задержки между появлением интрацеллюлярного льда в соседних клетках. Лед распространяется по каналам, сформированным аквапорином [400, 401].

Этот белок обнаружен в различных организмах от растений и бактерий до млекопитающих [402]; в мембранах он образует тетрамеры, в которых мономеры формируют каналы, проницаемые для воды, но не для заряженных ионов или молекул; пятый канал в центре тетрамера пропускает как воду, так и заряженные частицы [403]. Химическая блокировка пор снижает, но не прекращает распространение льда в контактирующих клетках [404]. Интенсивность процесса зависит от температуры; распространение льда прекращается для температуры выше некоторого порогового значения [399], что является следствием понижения температуры кристаллизации в капилляре [397]. Заметим, что анализ распространения фронта кристаллизации в порах диаметром 0,8–2,5 нм в рамках модели сплошной среды дает лишь качественное описание.

Доминирующий механизм нуклеации внутриклеточного льда зависит от типа клетки и свойств мембраны. В работе [405] рассмотрены три механизма: гомогенная нуклеация в цитоплазме, распространение льда через поры, распространение льда через повреждения мембраны, вызванные электрическим полем [406]. Поле возникает в результате взаимодействия содержащихся в растворе ионов с фронтом кристаллизации: на фазовой границе формируется двойной электрический слой, вызывающий появление разности потенциалов между твердой и жидкой фазами — потенциала замерзания. Этот эффект, называемый эффектом Воркмана–Рейнольдса [407], считается ответственным (наряду с переносом заряда при соударении частиц льда [408]) за разделение зарядов в грозных облаках [409] и генерацию электромагнитного излучения растущим льдом [410]. Вероятность электрического пробоя мембраны возрастает при понижении температуры вследствие роста поверхностного натяжения липидного бислоя.

Задача об образовании пор в мембране рассматривалась как в рамках модели сплошной среды [411, 412], так

и методом МД [413]. Рост внеклеточного льда приводит к изменению трансмембранного потенциала и перераспределению мембранных белков, обладающих дипольным моментом [414], что меняет проницаемость мембраны.

Оказалось, что ни одна из перечисленных моделей не объясняет всей совокупности экспериментальных данных по внутриклеточной кристаллизации при различных скоростях охлаждения и концентрации криопротектора. В [405] предложен новый механизм повреждения мембраны, связанный с интенсивным потоком воды под действием перепада осмотического давления и его механическим воздействием (трением) на составляющий мембрану липидный бислой. Сила трения в расчете на молекулу воды пропорциональна дрейфовой скорости: $F_t/n = fv$, которая определяется через массовый поток как $v = (J_w h)/n$, где h — глубина гидрофобной области мембраны. Тогда полная сила, действующая на мембрану, $F = fJ_w h$. Используя для оценки коэффициента трения аналог соотношения Эйнштейна $f = kT/D_w$, где D_w — коэффициент диффузии воды, авторы [415] находят среднее давление на мембрану $P = (kT/AD_w) J_w h$ (A — площадь поверхности мембраны), которое можно сопоставить с предельно допустимым. Подтверждение этой гипотезы содержится в работе [309], а в [416] предполагается, что состояние мембраны определяется совокупностью параметров — интенсивностью потока воды, перепадом осмотического давления и его уровнем.

Существенными факторами распространения льда являются взаимодействие клеток с экстрацеллюлярной матрицей [417], а также количество содержащейся в тканях воды [418]. Отличие поведения изолированной клетки от системы клеток наблюдалось для сферического (диаметр от 70 до 140 мкм) агрегата клеток вокруг заряженной частицы полистирола [419]. Роль взаимодействия с поверхностью авторы не обсуждают, однако она может быть существенной даже для изолированной клетки [420]. Анализ распространения воды и криопротектора в островках биологической ткани, содержащих тысячи клеток, показал, что свойства клеточных мембран являются определяющими, однако эффекты интерстициальной диффузии необходимо учитывать [421]. При некоторых условиях в замороженном образце наблюдается сеть кристаллов льда во внеклеточном пространстве [422].

Осмотический эффект и кристаллизация льда вызывают необратимые изменения в тканях: так, разрушенные связи клеток не восстанавливаются после оттаивания, что меняет микроструктуру, механические и теплофизические свойства ткани [418, 423–425]; появляются пустоты [426], образующие в ряде случаев (например, в тканях печени) правильные структуры. Последнее обстоятельство предложено использовать в судебной медицине (можно установить, подвергались ли ранее ткани замораживанию [427]).

Еще один путь распространения ледяного фронта в тканях — по кровеносным сосудам [34]. Рост кристаллов льда в микрососудах (диаметр артериол 10–15 мкм, капилляров 4 мкм [428]) происходит иначе, чем в крупных сосудах. Недавно опубликованы результаты исследования понижения температуры кристаллизации воды [429] и распространения льда [430] в стеклянных капиллярах, которые показали существование критического радиуса, ниже которого распространение фронта

резко замедляется или прекращается. Предельное переохлаждение ΔT с учетом кривизны фронта и осмотического эффекта записывается как

$$\Delta T = \frac{2v_s \sigma^{ls} T_m \cos \alpha}{Lr} + \frac{v_l \pi_1 T_m}{L},$$

где v_s и v_l — удельные объемы твердой и жидкой фаз, π_1 — осмотическое давление раствора, r — радиус капилляра, α — угол между межфазной границей и стенкой капилляра, удовлетворяющий соотношению Юнга $\sigma^{lb} = \sigma^{sb} + \sigma^{ls} \cos \alpha$ (кривизна фронта $k = 2 \cos \alpha/r$).

Эксперименты в капиллярах радиусом от 1,5 до 87,5 мкм показали, что критический радиус r_0 , ниже которого распространение льда невозможно, с хорошей точностью связан с наименьшей длиной волны λ_0 в анализе устойчивости плоского фронта Мюллинса и Секерки: $r_0 \approx \lambda_0/4$. Авторы предупреждают, что перенос результатов на задачи криобиологии требует осторожности в силу отличия угла смачивания и упругости стенок кровеносных сосудов.

Несмотря на значительные успехи (так, в работах [431, 432] сообщается о восстановлении упругих и вязкоупругих свойств стенок кровеносных сосудов человека) применение криоконсервации тканей и, в особенности, органов [42] сталкивается с серьезными проблемами. Во-первых, присутствие различных типов клеток затрудняет нахождение оптимальных протоколов замораживания и оттаивания. Другая сложность — невозможность обеспечить однородность температуры для образцов заметного размера. Как следствие, в тканях возникают термоупругие напряжения, часто приводящие к формированию трещин [433]. Последние нарушают целостность тканей и, кроме того, повышают опасность девитрификации при нагреве, так как стимулируют гетерогенную нуклеацию кристаллов льда [127]. Опасность растрескивания при витрификации выше, чем при криохирургических операциях, в силу более хрупкого стеклообразного состояния и более высоких градиентов температуры. Поэтому исследование медленного охлаждения тканей в присутствии криопротектора по-прежнему актуально [434, 435]. Поскольку присутствие криопротектора в тканях существенно меняет коэффициент теплового расширения [436], неоднородность насыщения тканей также приводит к появлению механических напряжений; величина деформации зависит как от концентрации криопротектора, так и от скорости охлаждения [437]. Анализ напряжений в образце в случае смешанного кристаллического/аморфного состояния требует учета вязкоупругого поведения последнего [376].

2.2.4. Криовоздействие *in vivo*. Криодеструкция биологических тканей в живом организме оказывается значительно более глубокой, чем можно было предполагать на основе исследований одиночных клеток и тканей *in vitro* [438]. Главным дополнительным механизмом является нарушение кровообращения [35, 439]: наибольшее разрушение наблюдается для мелких сосудов; стенки крупных артериальных сосудов, как правило, после оттаивания восстанавливают свои свойства.

Повреждения кровеносных сосудов при замораживании впервые было описано в 1877 году [366] (в существовании этого эффекта можно убедиться, погуляв без перчаток в сильный мороз). Степень сосудистых повреж-

дений определяется тепловой историей; в основе деструкции лежит перераспределение воды [440]. Можно выделить три группы повреждений: 1) механическая деформация стенок вследствие образования льда в русле сосуда (диаметр мелких сосудов увеличивается более чем вдвое [441]); 2) гибель или отсоединение клеток эндотелия от стенок сосуда [439, 442] и 3) нарушение собственно кровообращения [438], которое проявляется через несколько часов или дней после операции, в зависимости от размера сосуда [443].

Трудности описания теплообмена в живых тканях связаны с необходимостью учитывать перенос тепла кровью и определяются как сложностью системы кровеносных сосудов [444], сеть которых образует фрактальные структуры [445], так и изменением интенсивности перфузии при повреждении тканей [446].

Модели вклада кровообращения в теплообмен делятся на континуальные и сосудистые [447, 448]. Первые сводятся к введению эффективной теплопроводности среды и/или добавлению объемного источника тепла в уравнении энергии. Наиболее известно уравнение Пеннеса [449]

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \lambda \nabla T + c_b \omega (T_a - T) + \dot{q}_{\text{met}} + Q^{\text{ext}},$$

где T и λ — температура и теплопроводность тканей как гомогенной среды, ω — коэффициент перфузии, имеющий размерность массового потока крови в тканях на единицу объема, c_b — теплоемкость крови, T_a — температура артериальной крови, \dot{q}_{met} и Q^{ext} — выделение тепла за счет метаболических реакций (этим эффектом в задачах криобиологии, как правило, можно пренебречь) и поглощения энергии внешнего источника. Предполагается, что теплообмен происходит только в капиллярах, куда поступает кровь с температурой T_a . Другими словами, длина установления теплового равновесия с окружающими тканями принимается бесконечной для всех сосудов, кроме капилляров, и нулевой для последних. Температура ткани в модели Пеннеса определяется как средняя по объему δV

$$T(\mathbf{r}) = \frac{1}{\delta V} \int_{\delta V} T(\mathbf{r}) dV,$$

где линейный масштаб $\sqrt[3]{\delta V}$ предполагается малым в сравнении с рассматриваемой областью, но большим по сравнению с диаметром "термически важных" кровеносных сосудов. Как отмечено в работе [450], для развитой кровеносной системы такого масштаба не существует. Многочисленные исследования (см., например, [451–454]) показали, что теплообмен в основном происходит в более крупных сосудах и в капилляры поступает кровь, уже находящаяся в тепловом равновесии с окружающими тканями. Тем не менее простая модель Пеннеса часто оказывается точнее [447, 455] более изощренных моделей.

Модель, учитывающая эффект зависимости теплообмена в тканях от размера кровеносных сосудов путем введения "длины термализации" L_c как расстояния, на котором разница температуры крови и окружающей ткани уменьшается в "е" раз, предложена в работе [452]:

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \lambda \nabla T + (\rho c)_b \omega^* (T_a^* - T) - (\rho c)_b \bar{u} \nabla T + \nabla \lambda_p \nabla T + \dot{q}_{\text{met}} + Q^{\text{ext}}.$$

Здесь член $(\rho c)_b \bar{u} \nabla T$ описывает вклад в теплообмен движения крови, находящейся в тепловом равновесии с тканью, а $\nabla \lambda_p \nabla T$ — эффект дополнительной "перфузионной" теплопроводности

$$\lambda_p = \pi n (\rho c)_b r_b^2 \bar{V} \cos^2 \gamma \sum_{i=1}^{\infty} \frac{L_c}{L_c^2 \beta_i^2 + 1},$$

где γ — угол между направлением кровеносных сосудов и градиентом температуры тканей, n — число сосудов и r_b — их радиус, параметр β принимается обратно пропорциональным длине сосуда.

Элементы структуры сети кровеносных сосудов (в частности, присутствие пар "артерия – вена") были включены в трехтемпературную модель Вейнбаума с соавторами [456]. Температура венозной крови в этой модели описывается явно. Позднее модель была упрощена до одного уравнения [457]

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \lambda_{\text{eff}} \nabla T + \dot{q}_{\text{met}}.$$

Тензор эффективной теплопроводности определяется как

$$\lambda_{\text{eff}}^{ij} = k_t \left[\delta_{ij} + \frac{\pi^2 n r_b^2}{4\sigma} \left(\frac{\lambda_{b1}}{\lambda_t} \right)^2 \text{Pe}^2 l_i l_j \right],$$

где n — геометрический параметр, определяющий плотность кровеносных сосудов, r_b принимается равным для артерий и вен, l_i — направляющие косинусы сосудов, число Пекле $\text{Pe} = 2\rho_{b1} c_{b1} r_b u / \lambda_{b1}$, σ — параметр, характеризующий теплообмен между артерией и веной. Согласно оценке авторов [457] анизотропные поправки к коэффициенту эффективной теплопроводности существенны, если радиус кровеносных сосудов превышает 100 мкм.

Сосудистые модели теплообмена кровообращением многочисленны и разнообразны по сложности [447]; некоторые основаны на конкретной анатомической информации о кровеносной системе. Наконец, возможно явное рассмотрение вклада крупного кровеносного сосуда в теплообмен либо заданием температуры стенки сосуда [458, 459], либо с использованием уравнений Навье – Стокса несжимаемой жидкости [460], или в предположении паузейлева течения; особенности реологии крови обычно не учитываются [19, 461–464].

Известны подходы, использующие строгий математический аппарат. В [12] метод гомогенизации применен к многомасштабной периодической задаче. В монографии [465] рассматривается иерархическая система взаимодействующих сосудов разных уровней (размеров); показано, в частности, что скорость крови нелокальным образом зависит от распределения температуры тканей.

Вклад переноса тепла кровью в теплообмен в задачах криохирургии замечен [108], но не столь важен, как при анализе гипертермии или биофизической реакции тканей на ожог [466]. В экспериментах *in vitro* с искусственным кровообращением (эмуляция теплообмена *in vivo*) [467] и в экспериментальном и численном исследовании остеонекроза [468] установлено, что этот механизм теплообмена может быть существенным при оттаивании. Исключение, естественно, составляет крупный кровеносный сосуд(ы) вблизи области криовоздействия — учет такого источника тепла необходим для корректного описания зоны некроза [469].

В отличие от криоконсервации, скорость охлаждения в криохирургии обычно не является определяющей [443, 470], отчасти в силу значительного изменения этого параметра в области воздействия. Принципиально медленное отогревание [470] приводит, во-первых, к временному гипотоническому окружению клеток (и, как следствие, к поступлению воды в клетку и возможному разрыву мембраны [34, 40, 312]), во-вторых, к интенсивной рекристаллизации льда, наиболее существенной в диапазоне температур от -40 до -15°C . Велика роль повторного замораживания [55, 123, 124, 471]: так, в работе [472] это позволило снизить на 20°C критическую температуру, обеспечивающую криоабляцию.

3. Криовоздействие *in silico*

3.1. Микроскопические модели

Метод молекулярной динамики *per se* и как элемент более сложных вычислительных процедур (см., например, [473–476] и цитированную там литературу) является одним из основных подходов к исследованию биофизических проблем; его применения к задачам криобиологии пока немногочисленны. Трудоемкость метода вынуждает использовать упрощенные и гибридные модели макромолекул и/или многопроцессорные вычислительные комплексы⁷.

⁷ Эффективность параллельных вычислений характеризуется ускорением $S_n = T_1/T_n$ или эффективностью $E_n = T_1/nT_n$ (T_n — время расчета на системе из n процессоров), которая представляется в виде произведения трех факторов [477]: параллельной эффективности, численной эффективности и равномерности загрузки процессоров. Первая находится как отношение времени вычислений к суммарному времени, затраченному на вычисления и на обмены данными и ожидание сообщений: $E_n^{\text{par}} = T_{\text{comp}}/(T_{\text{comp}} + T_{\text{comm}})$ (время на передачу/прием сообщений сокращается использованием асинхронного режима — одновременного выполнения обменов и вычислений). Численная эффективность отражает увеличение объема вычислений (например, числа итераций) при распараллеливании алгоритма и меняется в широких пределах в зависимости от задачи и метода решения. Равномерность загрузки процессоров реализуется статически или динамически. В идеале 1) число частиц или ячеек, "приписанных" процессору, пропорционально его производительности; 2) объем и частота межпроцессорных обменов данными минимальны (можно дополнительно минимизировать число пар процессоров, нуждающихся в обмене данными). Противоречивость требований очевидна: минимум коммуникаций достигается при расчете на одном процессоре. Таким образом, формулируется задача минимизации $T = T_{\text{comp}} + T_{\text{comm}}$ с ограничениями. Для широкого класса задач $T_{\text{comp}} = \max_q(N_q T_q)$, где q -му процессору приписано N_q ячеек или частиц, T_q — время одного шага или итерации. Для наиболее распространенных систем — кластеров рабочих станций, соединенных с помощью Ethernet или Myrinet, — можно записать $T_{\text{comm}} = \sum_{pq}[C_{pq}/b + \delta(C_{pq})L]$, где C_{pq} — коммуникационная матрица, b — эффективная ширина пропускания сети, а L — ее латентность [478].

Метод МД с короткодействующими потенциалами идеально подходит для распараллеливания, о способах эффективной реализации дальнедействующих электростатических взаимодействий см. [479–481]. Эффективность комплекса программ NAMD [482] для решения биофизических проблем достигает 85 % и 70 % на системах, включающих 1024 [483] и 2250 процессоров [480]. Более сложной является реализация метода на распределенных ресурсах GRID, прежде всего обеспечение равномерной загрузки процессоров в силу динамической природы и гетерогенности вычислительной среды [484]. Существует вычислительная система (MDM [485]), архитектура которой разработана для крупномасштабных расчетов методом МД.

Предложено множество моделей молекулы воды (см., например, [153, 486–492] и приведенные там ссылки), отличающихся структурой (числом зарядов, их расположением, характером связей, учетом поляризуемости молекулы и т.п.), точностью воспроизведения экспериментальных зависимостей и пригодностью для высокопроизводительных вычислений; недавние эксперименты по рентгеновскому комптоновскому рассеянию [493] указывают на необходимость включения в модель корреляции длины O–H связи со структурой сетки водородных связей. Сопоставление моделей по точности предсказания температуры плавления льда I_h и других параметров фазовой диаграммы можно найти в [491, 492], по применимости к описанию динамики белков и нуклеиновых кислот в растворах — в [487].

Серьезные трудности представляет собой моделирование гомогенной нуклеации воды; первые МД-расчеты (весьма трудоемкие — потребовалось рассмотрение временного интервала в 200–300 нс с шагом интегрирования 1 фмс) опубликованы в 2002 г. [494]. Проблема в сложности поверхности потенциальной энергии (ППЭ) в $6N$ -мерном конфигурационном пространстве (N — число частиц в расчете), которая имеет большое число локальных минимумов, т.е. допускает огромное число возможных конфигураций сетки водородных связей [495]. Топологические свойства ППЭ связаны с термодинамическими и динамическими свойствами переохлажденной воды [496]. Результаты расчетов методом МД весьма чувствительны к виду выбранного потенциала взаимодействия молекул [152] и могут как завышать, так и занижать степень структурированности воды [497]. Мерой последней служит набор параметров порядка, описывающих геометрические свойства связей соседних молекул, которые основаны на разложении парной корреляционной функции в сферических координатах, плюс трехчастичный параметр тетраэдричности; нуклеация описывается с помощью траектории минимальной свободной энергии в пространстве параметров порядка [498]. Двух- и трехчастичные параметры порядка использованы в работе [364] для определения величины энергетического нуклеационного барьера в различных ситуациях: гомогенная жидкость, вода в гидрофобной поре, вода в постоянном электрическом поле, вода в смеси с CO_2 , вода плюс белок-антифриз.

Более простым является моделирование плавления, кристаллизации в пространственно ограниченных системах, проведенное в цитированных в разделе 2.1 работах, или кристаллизации воды, находящейся в контакте с поверхностью льда [499].

Моделирование кристаллизации водного раствора NaCl, контактирующего с кубическим льдом I_c , проведено в работах [500, 501]; для воды использовался неполяризуемый потенциал SPC/E. Неустойчивость фронта кристаллизации приводит к формированию полостей, содержащих незамерзший концентрированный рассол; продвижение фронта связано с локальными флуктуациями концентрации соли. Заметим, что рассмотренная задача интересна и для геофизики: повышение плотности раствора подо льдом существенно влияет на характер циркуляции водных масс океана.

Осмотический перенос в цилиндрической поре в отсутствие взаимодействия молекул со стенками исследовался в [502], а перенос воды через липидный бислой — в [503], где отмечено, что характерное время переноса

молекулы воды велико (порядка 100 пс), поэтому эффективнее использовать метод МД не для прямого моделирования, а для получения (на основании рассчитанной функции распределения молекул воды по глубине) коэффициентов, необходимых для макроскопического описания переноса.

Использование решеточных [286] моделей макромолекул снижает требования к вычислительным ресурсам благодаря радикальному уменьшению числа возможных конформаций. При этом, однако, *a priori* вводится анизотропия пространства [504]; поэтому в последнее время значительное внимание уделяется безрешеточным (off-lattice) моделям. Молекулы воды и элементы макромолекулы представляются как сферы различного диаметра; взаимодействие элементов молекулы i и j , которые не являются соседями, описывается короткодействующим парным потенциалом, часто обрезанным потенциалом Леннарда-Джонса

$$V_{ij}(r) = \begin{cases} \epsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 + v_{ij} \right], & r \leq R_{ij}, \\ 0, & r > R_{ij}. \end{cases}$$

Здесь сдвиг v_{ij} обеспечивает непрерывность потенциала при $r = R_{ij}$, а радиус обрезания выбирается в зависимости от свойств элементов i и j . Для отслеживания положения частиц используется алгоритм "случайных решеток" [505].

Основные приемы построения гибридных моделей состоят, во-первых, в замене пространственного элемента (например, фосфатной или метильной группы) макромолекулы одной частицей или парой частиц с некоторыми эффективными свойствами; группу молекул воды также можно представить "эффективным" атомом [506]; и, во-вторых, в сочетании дискретного (атомарного) рассмотрения макромолекулы и континуального описания эффектов растворителя (в данном случае воды) [507]. Недавно опубликован обширный обзор методов такого "невяного" описания воды применительно к моделированию свойств и функционирования биологических мембран [508].

В НР-модели белка [509] (и ее безрешеточном обобщении — АВ-модели [510, 511]) аминокислотные остатки сводятся к точечным объектам, которые являются либо полярными (Р, представляются зарядом или диполем), либо неполярными (Н) [282]. Гидрофобность описывается как стремление уменьшить площадь поверхности контакта с водой и связана с упорядочением ближайших молекул воды в энергетически более выгодную структуру, подобную льду. Формально этот эффект можно представить как притягивающее взаимодействие неполярных остатков аминокислот, что позволяет исключить степени свободы, связанные с водой. В цитированной работе, однако, вода рассматривается явно, занимая узлы решетки, свободные от элементов белка. Возможность молекул воды формировать структуры учитывается введением q состояний, в одном из которых находится вода (точнее, группа молекул воды) в узле; в работе рассмотрена бимодальная модель $q = 2$. Энергия каждого аминокислотного остатка зависит от состояния воды в соседних узлах. Явное описание воды оказывается необходимым для корректного моделирования холодовой денатурации белка [512].

Простая модель гидрофобного взаимодействия не воспроизводит эффект давления на холодовую денату-

рацию белка; описание этого процесса при повышенном давлении требует учета флуктуаций плотности воды [513]. В цитированной работе рассмотрен неполярный гомополимер, взаимодействие которого с водой (частичная организация молекул воды вокруг белка) определяется гамильтонианом

$$H_p = J_r n_{\text{HB}} \left(n_{\text{max}} - \sum_{i,j} n_i n_j \right),$$

где параметр J_r задает силу отталкивающего взаимодействия, $n_{\text{HB}} \equiv N_{\text{HB}}/N_{\text{W}}$ — численная плотность водородных связей, увеличивающих объем системы, N_{W} — число молекул воды, n_{max} — максимальное число контактов аминокислотных остатков белка друг с другом; $n_i = 1$, если i -й узел решетки занят остатком, и 0 в противном случае. Выражение в круглых скобках — мера компактности белка. Гамильтониан взаимодействия молекул воды между собой записывается как

$$H_{\text{HB}} = -J \sum_{i,j} \delta_{\sigma_i, \sigma_j},$$

переменная σ_i определяет ориентацию молекулы воды — образовании водородной связи между соседними молекулами i и j возможно, если $\sigma_i = \sigma_j$ [513]. Энтальпия для системы "белок в водяной бане" $W = H_p + H_{\text{HB}} + PV$. Авторы использовали для расчетов двухпараметрической (число водородных связей и число контактов аминокислотных остатков) плотности состояний мультиканонический алгоритм метода Монте-Карло [514]; далее находилась зависимость среднего числа контактов остатков \bar{N}_c от температуры и давления, условие денатурации формулировалось как $\bar{N}_c/n_{\text{max}} \geq \alpha_d$ (в работе принималось $\alpha_d = 0,96$).

Используются и другие способы явного учета молекул воды (например, модель растворителя-фантома, в которой молекулы воды взаимодействуют с макромолекулами, но не друг с другом [504]).

Метод МД использован для анализа состояния белка-антифриза, извлекаемого из камбалы *Pseudopleuronectes americanus*, в вакууме, в водном растворе и адсорбированного на поверхности льда [515]. Выявлены наиболее предпочтительные кристаллографические плоскости льда для ингибирующего действия белка, сравнительная роль водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса, эффекты возможных мутаций белка (удаления одной из пептидных групп). В работах [362, 516, 517] с помощью этого подхода и минимизации энергии системы лед-белок-антифриз в вакууме и в воде исследовано, какие именно пептидные группы ответственны за подавление роста кристаллов льда. Показано, что вопреки существовавшему мнению в связывании белка-антифриза со льдом существенную роль играют гидрофобные аминокислотные остатки. Эффекты растворителя в системе вода-лед-белок-антифриз рассмотрены в [518].

Сравнительный анализ трех дисахаридов применительно к возможному их использованию в качестве криопротекторов выполнен методом МД в [519]; показано, что трегалоза (α -D-глюкопираносил- α -D-глюкопираносид) обеспечивает связывание большего числа молекул воды и более высокую однородность раствора, снижая тем самым вероятность нуклеации. Способность трегалозы эффективно разрушать тетраэдраль-

ную структуру воды и препятствовать кристаллизации льда подтверждается исследованием теплофизических свойств растворов ряда дисахаридов методом ДСК [520].

Свойства липидных мембран определяются физическими и химическими процессами на масштабах от атомарного до мезоскопического (микрон) в широком диапазоне характерных времен. Различные модели ориентированы на разные пространственные и временные масштабы; в идеале эти модели должны быть сопряжены (многомасштабное моделирование), что требует описания двухстороннего потока информации при переходе от одного уровня описания к другому. Обзор работ по моделированию билипидных мембран при нормальной температуре методом МД, выполненных до 2000 г., сделан в [521]; более поздние модели рассмотрены в [272, 504, 522]. Модельные липидные системы [301] (монослой на границе воздух–вода, называемый ленгмюровским монослоем; планарные бислои; сборки бислоев в ламеллярной фазе), помимо своего основного назначения — изучения общих свойств биологических мембран, представляют, в силу своей относительной простоты, идеальный объект для отработки и верификации методов моделирования. В недавней работе [523] проведено сравнение олигомерных цепей в изолированном состоянии и в составе мембранной структуры; расчет параметра порядка связей С–С и С–Н относительно главной оси тензора инерции макромолекулы показал, что собственные свойства цепи, определяемые ее строением, проявляются и в мембране. Моделирование поведения мембранного белка выполнено в работе [199]. Наибольшее внимание в настоящее время уделяется моделированию ионных каналов [403, 524, 525]; рассматриваются возможность использования углеводородных трубок для физического моделирования биологических процессов переноса [526] и коллективная динамика ионных каналов [527].

Метод МД использован для изучения взаимодействия ряда криопротекторов (трегалозы, глюкозы, метанола, ДМСО) с модельными мембранами, отличающимися степенью насыщенности липидов при постоянной температуре в [522, 528]; в частности, показано, что небольшие органические молекулы уменьшают толщину мембраны, увеличивают площадь в расчете на одну липидную молекулу и проницаемость мембраны. Защитный механизм сахаров, в том числе сахарозы и трегалозы, связан с замещением молекул воды [203] в водородных связях с головными частями липидов (которые в отсутствие криопротектора обеспечиваются молекулами воды) и стабилизацией структуры липидного бислоя — значительным сдвигом температуры главного фазового перехода. Количественно эффект описывается параметром порядка

$$S_{CD} = -\left(\frac{2}{3} S_{xx} + \frac{1}{3} S_{yy}\right),$$

где $S_{\alpha\beta} = \langle 3 \cos \Theta_\alpha \cos \Theta_\beta - \delta_{\alpha\beta} \rangle$ ($\alpha, \beta = x, y, z$), $\cos \Theta_\alpha = \mathbf{e}_\alpha \mathbf{e}_\beta$, \mathbf{e}_z — единичный вектор в направлении z в лабораторной системе координат, а \mathbf{e}_α — единичный вектор в локальной системе, определяемой тремя последовательными атомами углерода C_{i-1}, C_i, C_{i+1} в хвосте липидной молекулы, $\mathbf{e} = \mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_{i-1}$. Этот параметр, доступный экспериментально определению методом ядерного магнитного резонанса, характеризует ориента-

цию углеводородных хвостов по отношению к нормали к липидному бислою.

При низких температурах упорядоченность хвостов возрастает, что способствует фазовому переходу слоя в гель. Заметим, что задача о взаимодействии низкомолекулярных органических веществ с липидной мембраной возникает также в виноделии: взаимодействие молекул спиртов с мембраной клеток дрожжей приводит к изменению конформаций трансмембранных белков и нарушению их функций (остановка ферментации) [528].

Упомянутые выше модели описывают макромолекулы как гибкие цепи. Во многих случаях применимы более простые (так называемые спиновые) модели, рассматривающие ориентацию амфифилов как единого объекта [504]. Наконец, возможно континуальное описание систем амфифилов функционалом свободной энергии, зависящим от небольшого числа макроскопических параметров, например от локальных концентраций, — модели типа модели Гинзбурга–Ландау.

3.2. Имитационные модели

Распространение внутриклеточного льда. В [529] распространение льда в плотноупакованном кластере из четырех концентрических сферических слоев клеток считалось мгновенным; в [530] было показано, что это допущение неверно и необходимо учитывать конечную скорость распространения внутриклеточного льда.

В работе [404] пара изолированных клеток рассматривается как система с конечным числом состояний: (0) — льда нет ни в одной из клеток; (1) — лед в какой-либо одной клетке; (2) — лед в обеих клетках. Состояние ансамбля пар клеток описывается двумя параметрами, например вероятностями незамороженного $P_0 = N_0/N$ и "синглетного" $P_1 = N_1/N$ состояний ($P_2 = 1 - P_1 - P_0$). Эволюция ансамбля определяется двумя независимыми стохастическими процессами — спонтанной нуклеацией J_s и распространением льда через межклеточный контакт J_p . Очевидно,

$$\frac{dN_0}{dt} = -2J_s N_0 \quad \text{и} \quad \frac{dN_2}{dt} = (J_s + J_p) N_1.$$

Вводя безразмерное время $\tau = \int_0^t J_s dt$ и параметр взаимодействия $\alpha = J_p/J_s$, можно записать

$$\frac{d}{d\tau} \begin{bmatrix} P_0 \\ P_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -2 & 0 \\ 2 & -(1+\alpha) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_0 \\ P_1 \end{bmatrix}.$$

Видно, что $P_0(\tau) = \exp(-2\tau)$. В случае постоянного α аналитическое решение для P_1 имеет вид [404]

$$P_1(\tau) = \begin{cases} \frac{2}{1-\alpha} \exp[-(1+\alpha)\tau - \exp(-2\tau)], & \alpha \neq 1, \\ 2\tau \exp(-2\tau), & \alpha = 1. \end{cases}$$

Наибольшая вероятность синглетного состояния

$$P_1^* = \left(\frac{1+\alpha}{2}\right)^{(1+\alpha)/(1-\alpha)}$$

достигается при

$$\tau^* = \frac{1}{1-\alpha} \ln \frac{2}{1+\alpha}.$$

Образование и распространение льда в агрегатах клеток рассматривалось в предположении, что скорость нуклеации в данной клетке определяется как $J = J_s + mJ_p$, где m — число соседних клеток [531]. Общее число состояний в системе N клеток $M = 2^{N-1} + 2^{(N-1)-2}$. В ансамбле идентичных агрегатов клеток эволюция вектора \mathbf{P} вероятностей P_ξ каждого состояния ($\xi = 0, \dots, M-1$) описывается как

$$\frac{d\mathbf{P}}{dt} = \mathbf{Q}(\alpha) \mathbf{P},$$

где матрица \mathbf{Q} содержит скорости всех переходов между состояниями. Для $N = 4$ в цитированной работе приведено аналитическое решение; при больших N образование внутриклеточного льда моделировалось с помощью метода Монте-Карло; в работе [531] рассматривался одномерный массив из 100 клеток, а в работах [532, 533] — двумерные задачи для числа соседей $m = 6$ и $m = 4$. При рассмотрении области, содержащей как патологические ("t"), так и здоровые ("h") ткани, скорость нуклеации записывается в виде [532]

$$J = J_s + m^t J_p^t + m^h J_p^h,$$

при этом в задаче появляется новый параметр, характеризующий отношение скоростей распространения льда $\beta = J_p^t / J_p^h$. Проведенные в широком диапазоне значений скорости распространения льда в здоровых тканях расчеты выявили три режима роста, отличающихся, в частности, зависимостью вероятности ликвидации патологической ткани от параметра β [532]. В работе [533] также предложена модификация уже упоминавшейся модели Джонсона – Мела – Авраами – Колмогорова.

3.3. Макроскопические модели

3.3.1. Клетка в растворе. Двумерные задачи о взаимодействии изолированной клетки с ледяным фронтом рассмотрены в работах [534, 535] с помощью произвольного эйлера-лагранжева метода на регулярных и неструктурированных треугольных сетках и в [536] с помощью метода подгонки интерфейса на фиксированных декартовых сетках [537]. В первых работах рассмотрен захват клетки движущимся фронтом кристаллизации, в [536] — поведение цилиндрического фронта кристаллизации, коаксиального находящейся в центре клетке (разрешение эволюции формы фронта потребовало сеток размером до 250 000 ячеек). Изменение объема клетки вследствие дегидратации в цитированных работах учитывалось, однако форма клетки (цилиндрическая в двумерной постановке) предполагалась неизменной.

Метод расчета замораживания биологических суспензий, основанный на подходе "множества уровней" Ошера и Сетиана, предложен в работе [538].

3.3.2. Численное исследование теплообмена. Методы расчета теплообмена с кристаллизацией описаны во многих публикациях (см., например, обзор [539]). Типичные значения теплофизических параметров биологических тканей приведены в работе [540].

Точные решения одномерного уравнения теплообмена в тканях для многоблочной области для постоянных теплофизических свойств получены в [541] (декартовы и сферические координаты) и [542] (цилиндрические координаты); случай нестационарных источников и

нестационарных граничных условий рассмотрен в [543], а синусоидального во времени теплового потока для полуплоскости — в [544]; решение в виде рядов для двумерной задачи о паре сосудов в ограниченной среде выписано в работе [545].

Метод конечных разностей для определения двумерного поля температур около криозонда впервые был использован, по-видимому, в работе [546]. В [547] (см. также приведенные там ссылки) описан метод граничных элементов, примененный для расчета поля температуры в двух- и трехзондовой системе. Метод конечных элементов использован для двумерного расчета теплообмена в криохирургии в [548], а метод конечных объемов на неструктурированных треугольных сетках [549, 550] — в работах [551, 552]. Осесимметричная задача о формировании ледяного шара вокруг одиночного криозонда решалась в работе [553] методом конечных элементов в трехмерной постановке в декартовых координатах. Использовалась анизотропная адаптация неструктурированной сетки, предложенная авторами ранее [554, 555]. Линеаризованные уравнения решались методом GMRES из библиотеки PETSC с предобуславливанием с помощью метода неполной факторизации ILU.

Точность расчета теплообмена возрастает, если в процессе операции отслеживается [556–560] граница ледяного фронта; в этом случае для расчета можно использовать метод граничных элементов [561, 562]. Восстановление формы области криовоздействия по экспериментальным данным представляет самостоятельную задачу [563]. Решение этой некорректной задачи в случае криохирургии упрощается использованием априорной информации о характере и эволюции замороженной области [561]; однако значительная часть этой информации, например предположение о выпуклости фронта, относится только к однозондовым системам.

Теплообмен в многозондовой системе. Успех криохирургической операции определяется правильным назначением степени и скорости охлаждения/нагрева и точностью локализации воздействия низких температур, исключая повреждение окружающих здоровых тканей. Добиться этого не просто в силу ряда обстоятельств. Во-первых, протокол замораживания определяется, как правило, общими рекомендациями, не учитываются в полной мере размер и геометрическая форма опухоли, степень развитости капиллярной системы, характер окружающих тканей, близость стенок полых органов и т.п. Во-вторых, трудно оптимально разместить большое число криозондов, основываясь исключительно на опыте врача. Наконец, методы мониторинга операции (ультразвуковой [3], термометрический, матричное тепловидение [564], рентгеновская компьютерная томография [565, 566], магнитно-резонансная томография [567, 568], оптическая когерентная томография [569], электрическая импедансная томография [5]) не дают полной информации о трехмерном поле температуры. Распределение температуры внутри ледяного шара можно найти, либо используя экстраполяцию на основе математических моделей [570], либо в методе рентгеновской компьютерной томографии, основываясь на эмпирической связи результатов измерений (в единицах Хаунсфильда HU, которые нормируются по контрасту вода–воздух) с температурой [566]. Точность преобразования при этом ограничена в силу чувствительности к шуму и немоно-

тонности зависимости NU от температуры. Относительно просто определить положение ледяного фронта, но не границу зоны прямого крионекроза, объем которой обычно составляет около четверти объема ледяного шара [571].

Ценность моделирования определяется точностью предсказаний. В работе [572] систематизированы источники погрешности в задачах криохирургии; одним из важнейших является неопределенность теплофизических свойств тканей при низких температурах.

В работах [551, 552] проанализирована чувствительность решения к виду температурной зависимости эффективной теплопроводности замороженных тканей. (Ранее эта проблема рассматривалась аналитически в одномерном случае [573].) Была рассмотрена стационарная задача, т.е. стадия экспозиции криохирургического воздействия: в этом случае распределение температуры и положение области фазового перехода определяются только теплопроводностью тканей и не зависят от удельной теплоемкости и скрытой теплоты кристаллизации. В то же время стационарный двумерный расчет представляет собой "наихудший сценарий" с точки зрения сохранности окружающих здоровых тканей [574].

В проведенных расчетах (как и в известных авторам работах) предполагалось, что теплопроводность замороженной ткани зависит только от температуры (и, как правило, принимается равной теплопроводности льда). Погрешность, вносимую этим допущением, трудно оценить *a priori*. Было рассмотрено два случая: 1) постоянная теплопроводность (заметим, что ее значение не входит в постановку стационарной задачи) и 2) теплопроводность, полученная сращиванием температурных зависимостей для воды и льда.

Расчеты для систем, имеющих до 18 криозондов и зонд-обогреватель, показали, что неопределенность в теплофизических свойствах тканей может составлять десятки градусов в фиксированной точке или несколько сантиметров в размере зоны крионекроза, протяженность которой оценивалась по "летальной" изотерме [551].

Создание адекватной модели теплопроводности замороженной биологической ткани как гетерогенной среды, включающей помимо льда межклеточную матрицу и воду — витрифицированную или связанную [196, 575, 576], является самостоятельной задачей. Промежуточное решение можно получить в рамках традиционных подходов к определению эффективных свойств многофазных композитных материалов [577]. Этим, однако, все трудности не исчерпываются: и доля некристаллизовавшейся воды, и состояние межклеточной матрицы меняются в процессе криовоздействия. Известно, что первый цикл "замораживание — экспозиция — оттаивание" приводит к увеличению эффективной теплопроводности тканей [470] и, как следствие, к значительному (десятки процентов) увеличению объема ледяного шара [441]. В качестве возможных механизмов рассматриваются повреждение клеточных мембран и кровеносных сосудов [578]. Адекватное описание теплообмена при криовоздействии должно, таким образом, сопрягать макроскопический перенос тепла с анализом изменения структуры среды на мезоскопическом уровне, в частности, с анализом эффектов дегидратации клетки и образования внутриклеточного льда, которые определяются

в первую очередь (макроскопической) скоростью локального охлаждения тканей [305, 578].

Оптимизация криовоздействия. Постановка задачи оптимизации требует определения параметров оптимизации $\mathbf{p} = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ и целевой функции $F(\mathbf{p})$. В криохирургии параметры очевидны: температура (точнее, закон ее изменения во времени), число криозондов, их расположение [579–581]; иногда (и всегда при криоконсервации) параметры, определяющие ввод/вывод криопротектора (обычно кортеж трех параметров — концентрация, температура, длительность — для каждого шага процесса [39, 582]); при криоконсервации используется также ступенчатое охлаждение с длительной выдержкой образца при промежуточной температуре [583, 584] для обеспечения кристаллизации внеклеточного льда и дегидратации клеток с последующим быстрым охлаждением [44, 585]. Традиционное задание режимов охлаждения (нагрева) с кусочно-постоянной скоростью изменения температуры неоптимально в силу существенно нелинейной реакции тканей [586].

Сложнее выбор целевой функции. В радиационной терапии находится *доза облучения* или основанная на аппроксимации экспериментальных данных *вероятность поражения (сохранения)* патологической (здоровой) ткани [587], а построенные целевые функции называются физическими и биологическими соответственно. Поскольку реакция тканей зависит и от дозы, полученной окружением [89], используются также гистограммы *доза — объем*.

Планирование гипертермического воздействия часто основано на квадратичной функции, определяющей среднее отклонение рассчитанного поля температур T от желаемого (оптимального) T_0 $F(\mathbf{p}) = \int_{\Omega} (T - T_0)^2 dV$; иногда рассматривается одна или несколько контрольных точек в области опухоли [588, 589].

Можно, не ограничивая сверху температуру патологической ткани, указать T_d — минимальную температуру, обеспечивающую деструкцию. Дополнительно задается максимальная температура T_{lim} области здоровых тканей. При решении оптимизационной задачи $\min F(\mathbf{p})$, где

$$F(\mathbf{p}) = \int_{\Omega_{\text{tumor}}, T < T_d} (T - T_d)^2 dV,$$

ограничения на температуру $T \leq T_{lim}$ в области здоровых тканей $\Omega \setminus \Omega_{\text{tumor}}$ используются явно или вводятся методом штрафа в целевую функцию [13]

$$F(\mathbf{p}) = \int_{\Omega_{\text{tumor}}, T < T_d} (T - T_d)^2 dV + w \int_{\Omega \setminus \Omega_{\text{tumor}}, T \geq T_{lim}} (T - T_{lim})^2 dV.$$

Аналогичные подходы используются в криохирургии [581, 590]. Простейшие способы задания целевой функции — назначение критической ("летальной") температуры, обеспечивающей криодеструкцию, или в виде

$$F(\mathbf{p}) = \int_{\Omega} w(T) dV,$$

где весовая функция $w(T)$ равна 0 или 1 в соответствующих интервалах температуры и геометрических областях [580, 591]. В [548] введен параметр "индекс экспозиции

замораживания", равный произведению времени пребывания тканей при температуре ниже заданной на среднюю температуру за этот интервал времени

$$I = \int_{T_1}^{T_2} T(t) dt.$$

К сожалению, эти критерии не универсальны; одной из целей оптимизации может быть сокращение времени операции [124].

4. Заключение

Анализ процессов в биологических объектах при замораживании позволяет, учитывая различия в поведении клеток в водном растворе и тканей при криовоздействии *in vitro* и *in vivo*, выделить несколько уровней (масштабов) физических задач (таблица).

Таблица. Основные физические проблемы криобиологии

Биологический объект	Задача
Субклеточные объекты	Взаимодействие молекул криопротектора с мембраной Эволюция мембраны и цитоскелета Разрушение мембраны Распространение льда через поры
Изолированная клетка	Тепло- и массообмен с окружающей средой Взаимодействие с ледяным фронтом
Однородная ткань	"Эффективные" теплофизические свойства Теплообмен Распространение ледяного фронта Рекристаллизация льда Эффекты микроциркуляции крови
Система "опухоль + окружающие ткани + криозонды + зонды-обогреватели"	Глобальный теплообмен в системе Взаимодействие ледяных фронтов Возникновение механических напряжений Оптимизация протокола криовоздействия

Одной из наиболее важных задач представляется создание модели теплопроводности замороженной биологической ткани как гетерогенной среды с переменной во времени структурой, включающей помимо льда межклеточную матрицу и воду — витрифицированную и/или связанную. Ее решение требует создания гибридной модели, сочетающей макроскопическое описание переноса тепла с анализом изменения структуры среды на клеточном уровне. Другими актуальными задачами являются 1) микроскопическое моделирование формирования льда в цитоплазме — посредством гомогенной и гетерогенной нуклеации или путем распространения через поры мембраны — и взаимодействие кристаллов с мембраной и объектами, содержащимися в цитоплазме (в том числе в присутствии криопротекторов); 2) определение адекватной целевой функции для задач оптимизации.

Благодарности. Автор выражает благодарность Е.В. Галлактионову, И.А. Жмакину, Т.П. Жмакиной, А.М. Кузь-

мину, Д.Х. Оффенгейму, В.Л. Преображенскому, Г.Г. Прохорову, А.А. Шмидту, В.С. Юфереву за полезные обсуждения, а Э.А. Тропшу за интерес к работе. Работа поддержана в рамках Научной программы СПб НЦ РАН.

Список литературы

1. Бреслер С Е *УФН* **115** 121 (1975) [Bresler S E *Sov. Phys. Usp.* **18** 62 (1975)]
2. Бункин Ф В, Ляхов Г А, Шпилов К Ф *УФН* **165** 1145 (1995) [Bunkin F V, Lyakhov G A, Shipilov K F *Phys. Usp.* **38** 1099 (1995)]
3. Whittingham T A *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93** 84 (2007)
4. Седунов Б И, Франк-Каменецкий Д А *УФН* **79** 617 (1963) [Sedunov B I, Frank-Kamenetskiĭ D A *Sov. Phys. Usp.* **6** 279 (1963)]
5. Malmivuo J, Plonsey R *Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields* (New York: Oxford Univ. Press, 1995)
6. Davalos R V, Mir L M, Rubinsky B *Ann. Biomed. Eng.* **33** 223 (2005)
7. Edd J F et al. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **53** 1409 (2006)
8. Шалыгин А Н, Кротов К А *УФН* **160** (7) 83 (1990) [Shalygin A N, Krotov K A *Sov. Phys. Usp.* **33** 541 (1990)]
9. Бинги В Н, Савин А В *УФН* **173** 265 (2003) [Bingi V N, Savin A V *Phys. Usp.* **46** 259 (2003)]
10. Van Leeuwen G M J et al. *Phys. Med. Biol.* **44** 2367 (1999)
11. Wainwright P *Phys. Med. Biol.* **45** 2363 (2000)
12. Deuffhard P, Hochmuth R, ZIB-Report 02-31 (Berlin: Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin, 2002)
13. Deuffhard P, Mehrmann V *Berliner Math. Ges.* **9–21** (2002)
14. Vander Vorst A *Mikrotalasna Revija* (Nov) **2** (2005)
15. Berjano E J *BioMed. Eng. OnLine* **6** 1 (2006)
16. Бяков В М, Степанов С В *УФН* **176** 487 (2006) [Byakov V M, Stepanov S V *Phys. Usp.* **49** 469 (2006)]
17. Тучин В В *УФН* **167** 517 (1997) [Tuchin V V *Phys. Usp.* **40** 495 (1997)]
18. Verhey J F et al. *Phys. Med. Biol.* **48** 3595 (2003)
19. Mohammed Y, Verhey J F *BioMed. Eng. OnLine* **4** 2 (2005)
20. Romero-Méndez R, Franco W, Aguilar G *Phys. Med. Biol.* **52** 463 (2007)
21. Kim K, Guo Z *Comput. Meth. Prog. Biomed.* **86** 112 (2007)
22. *Mathematics and Physics of Emerging Biomedical Imaging* (Washington DC: National Acad. Press, 1996)
23. Heller R *Technol. Cancer Res. Treatment* **1** 317 (2002)
24. Becker S M, Kuznetsov A V *Int. J. Heat Mass Transfer* **50** 105 (2007)
25. ter Haar G *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93** 111 (2007)
26. Meairs S, Alonso A *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93** 354 (2007)
27. Руденко О В *УФН* **177** 374 (2007) [Rudenko O V *Phys. Usp.* **50** 359 (2007)]
28. Kinoshita K (Jr), Tsong T Y *Nature* **268** 438 (1977)
29. Mesquita M V et al. *Brazil. J. Phys.* **34** 459 (2004)
30. English N J, Mooney D A *J. Chem. Phys.* **126** 091105 (2007)
31. Matsumoto Y et al. *Exp. Thermal Fluid Sci.* **29** 255 (2005)
32. VanBavel E *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93** 374 (2007)
33. Pegg D E *Phys. Med. Biol.* **11** 209 (1966)
34. Rubinsky B *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2** 157 (2000)
35. Прохоров Г Г (Общ. ред.) *Достижения криомедицины: Материалы междунар. симп., 7–8 июня 2001 г., Санкт-Петербург* (СПб.: Наука, 2001)
36. Korpan N N (Ed.) *Basics of Cryosurgery* (Wien: Springer, 2001)
37. Vajda T *Cell. Mol. Life Sci.* **56** 398 (1999)
38. Goltsev A et al. *Cell Preserv. Technol.* **5** 33 (2007)
39. Karlsson J O M, Toner M, in *Principles of Tissue Engineering* (Eds R P Lanza, R Langer, J Vacanti) (San Diego, CA: Academic Press, 2000) p. 180
40. Rubinsky B *Heart Failure Rev.* **8** 277 (2003)
41. Brahma N K *Trends Biomater. Artif. Organs* **17** 17 (2004)
42. Fahy G M, Wolk B, Wu J *Rejuvenation Res.* **9** 279 (2005)
43. Sumida S *Cell Tissue Banking* **7** 265 (2006)
44. Petrunkina A M *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* **4** 78 (2007)
45. Madan A et al. *Drug Metab., Dispos.* **27** 327 (1999)
46. de Graaf I A M, Koster H J *Toxicology in Vitro* **17** (1) 1 (2003)
47. de Graaf I A M et al. *Cryobiology* **54** 1 (2007)
48. Карнаухов В Н, Гахова Э Н, Утепов В К (Ред.) *Консервация генетических ресурсов: Материалы XIV рабочего совещания,*

- Пушино 28–30 мая 1996 г. (Пушино: Ин-т биофизики клетки, 1996)
49. Engelmann F, Takagi H (Eds) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (JIRCAS Intern. Agriculture Ser., No. 8) (Tsukuba, Japan: Japan Intern. Res. Center for Agricultural Sci., 2000)
 50. Ruane J, Sonnino A (Eds) *The Role of Biotechnology in Exploring, Protecting Agricultural Genetic Resources* (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006)
 51. Özkavukcu S, Erdemli E *J. Ankara Med. School* **24** 187 (2002)
 52. Sumida S, in *Cryo 2006: 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Hamburg, Germany, July 24–27, 2006*, Abstracts Book, p. 134
 53. Stańczyk M, Telega J *Acta Bioeng. Biomech.* **5** 3 (2003)
 54. Andreevs M *D Am. Family Phys.* **10** 2355 (2004)
 55. Schmidt J D, Doyle J, Larison S *CA Cancer J. Clin.* **48** 239 (1998)
 56. Cooper S M, Dawber R P *J. R. Soc. Med.* **94** 196 (2001)
 57. Raudebaugh R, in *Microscale Heat Transfer: Fundamentals and Applications* (NATO Sci. Series. Ser. II, Vol. 193, Eds S Kakaç et al.) (Dordrecht: Springer, 2005) p. 445
 58. Diller K R *Cryobiology* **34** 304 (1997)
 59. Moore Y, Sofer P, Ilovich M, in *The Science, Technology Behind Cryosurgery, Galil Medical, March, 2001* Technical notes
 60. Альперович Б И, в кн. *Достижения криомедицины* (Под общ. ред. Г Г Прохорова) (СПб.: Наука, 2001) с. 4
 61. Devireddy R V et al. *Human Reprod.* **15** 1125 (2000)
 62. Polge C, Smith A U, Parkers A S *Nature* **164** 666 (1949)
 63. Schoof H et al. *J. Cryst. Growth* **209** 122 (2000)
 64. Müller-Reichert T et al. *J. Microscopy* **212** 71 (2003)
 65. McIntosh J R *J. Cell Biol.* **153** F25 (2001)
 66. Leis A P et al. *IEEE Signal Proc. Mag.* **95** 95 (2006)
 67. Lupetti P, in *From Cells to Proteins: Imaging Nature across Dimensions* (NATO Security Through Sci. Series. Ser. B, Vol. 3, Eds V Evangelista et al.) (Dordrecht: Springer, 2005) p. 53
 68. Болдырев А А, Кяйвярайнен Е И, Илюха В А *Биомембранология* (Петрозаводск: Инст. Биол. КарНЦ РАН, 2006)
 69. Vaumeister W *Protein Sci.* **14** 257 (2005)
 70. Сердюк И Н *Усп. биол. хим.* **42** 3 (2002)
 71. Chidamaram R, Sikka S K *Current Sci.* **85** 871 (2003)
 72. Вайнштейн Б К *УФН* **88** 527 (1966) [Vainshtein B K. *Sov. Phys. Usp.* **9** 251 (1966)]
 73. Лунин В Ю, Афонин П В, Уржумцев А Г *Матем. биол. и биоинформат.* **1** (1) 17 (2006)
 74. Тернов И М *УФН* **165** 429 (1995) [Ternov I M *Phys. Usp.* **38** 409 (1995)]
 75. Gilliland G L, Tung M, Ladner J J. *Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **101** 309 (1996)
 76. Nanev C N *Cryst. Res. Technol.* **42** 4 (2007)
 77. Lorber B *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* — Proteins Proteomics **1599** 1 (2002)
 78. Levitt M, Pratt B H *Structure* **1** 223 (1993)
 79. Nakasako M *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **359** 1191 (2004)
 80. Halle B *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **359** 1207 (2004)
 81. Chernov A A *J. Cryst. Growth* **174** 354 (1997)
 82. Kierzek A M, Zielenkiewicz P *Biophys. Chem.* **91** 1 (2001)
 83. Ke S C, Dehucas L J, Harrison J G *J. Phys. D: Appl. Phys.* **31** 1064 (1998)
 84. Petsev D N et al. *J. Cryst. Growth* **232** 21 (2001)
 85. Auer M *J. Mol. Med.* **78** 191 (2000)
 86. Ohno N et al. *J. Histochem. Cytochem.* **53** 55 (2005)
 87. Jeffree C E et al. *Planta* **172** 20 (1987)
 88. Halle B *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** 4793 (2004)
 89. Boyer A L et al. (Intensity Modulated Radiation Therapy Collab. Working Group) *Int. J. Rad. Oncology Biol. Phys.* **51** 880 (2001)
 90. Nilsson J, PhD Thesis (Stockholm Univ., 2004)
 91. Bucci M K, Bevan A, Roach M III *CA Cancer J. Clin.* **55** 117 (2005)
 92. Dumont F, Marechal P-A, Gervais P *Appl. Environ. Microbiol.* **72** 1330 (2006)
 93. Fujikawa S *J. Cell Sci.* **49** 369 (1981)
 94. Bank H, Mazur P *J. Cell Biol.* **57** 729 (1973)
 95. Raabe D *Modell. Simul. Mater. Sci. Eng.* **15** (2) 39 (2007)
 96. Cobb J P et al. *British J. Anaesth.* **77** 3 (1996)
 97. Raff M *Nature* **396** 119 (1998)
 98. Yang W L et al. *Int. J. Cancer* **103** 360 (2003)
 99. Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A *CA Cancer J. Clin.* **55** 178 (2005)
 100. Mayer B, Oberbauer R *News Physiol. Sci.* **18** 89 (2003)
 101. Schmid-Schönbein G W, Diller K R *Ann. Biomed. Eng.* **33** 1136 (2005)
 102. Forest V et al. *Cryobiology* **50** 29 (2005)
 103. Baust J G et al. *Cryobiology* **48** 190 (2004)
 104. Machlenkin A et al. *Clin. Cancer Res.* **11** 4955 (2005)
 105. Clarke D M et al. *Cryobiology* **49** 45 (2004)
 106. Rabin Y, Stahovich T F *Phys. Med. Biol.* **48** 619 (2003)
 107. Yu T-H, Liu J, Zhou Y-X *Cryobiology* **50** 174 (2005)
 108. Zhao G et al. *Med. Eng. Phys.* **29** 205 (2007)
 109. Kao B et al. *Lasers Surgery, Med.* **34** 146 (2004)
 110. Tuqan A T et al. *Lasers Med. Sci.* **20** 80 (2005)
 111. Kandra D, MS Thesis (Bangalore Univ., 2004)
 112. Zhang Q et al. *Int. J. Heat Mass Transfer* **42** 395 (1999)
 113. Robinson M P et al. *Phys. Med. Biol.* **47** 2311 (2002)
 114. HanYu Y, Ichikawa M, Matoumoto G *J. Microsc.* **165** 255 (1992)
 115. Шафранов В В и др. *Келоидные рубцы: этиология, клиническая, морфологическая, физикальная диагностика и лечение СВЧ-криогенным методом* (М.: ЦПР Деловая Лига, 2003)
 116. Hines-Peralta A et al. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **15** 1111 (2004)
 117. Huang J et al. *J. Acoust. Soc. Am.* **116** 2451 (2004)
 118. Ekstrand V, PhD Thesis (Stockholm: Karolinska Inst., 2005)
 119. Barun V V, Ivanov A P *Int. J. Heat Mass Transfer* **46** 3243 (2003)
 120. Loyd D et al. *Adv. Eng. Software* **28** 347 (1997)
 121. Roache P J *Verification and Validation in Computational Science and Engineering* (Albuquerque, NM: Hermosa Publ., 1998)
 122. Oberkampf W L, Trucano T G *Prog. Aerospace Sci.* **38** 209 (2002)
 123. Gill W, Fraser J, Carter D C *Nature* **219** 410 (1968)
 124. Chua K J, Chou S K, Ho J C *J. Biomech.* **40** 100 (2007)
 125. Rabin Y, Maytal B-Z *Cryo-Lett.* **20** 95 (1999)
 126. Sakai A, in *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (JIRCAS Intern. Agriculture Ser., No. 8, Eds F Engelmann, H Takagi) (Tsukuba, Japan: Japan Intern. Res. Center for Agriculture Sci., 2000) p. 1
 127. Brockbank R G M et al., in *Topics in Tissue Engineering* (Eds N Ashammakhi, P Ferretti) (Oulu, Finland: Univ. of Oulu, 2003) Ch. 12
 128. Shaw J M, Jones G M *Human Reprod. Update* **9** 583 (2003)
 129. Orief Y, Dafopoulos K *Middle East Fert. Soc. J.* **10** 171 (2005)
 130. Oyarzun R, Viedmal C, de Ignacio C *Geology* **28** 935 (2000)
 131. Liebermann J et al. *Biol. Reprod.* **67** 1671 (2002)
 132. Poole P H et al. *Comput. Mater. Sci.* **4** 373 (1995)
 133. Loerting T, Giovambattista N *J. Phys.: Condens. Matter* **18** R919 (2006)
 134. Buch V et al. *Int. Rev. Phys. Chem.* **23** 375 (2004)
 135. Anick D J *J. Mol. Struct.: Theochem* **587** 87 (2002)
 136. Маленков Г Г *ЖСХ* **47** (Приложение) S5 (2006) [Malenkov G G *J. Struct. Chem.* **47** (Suppl.) S1 (2006)]
 137. Giovambattista N, Stanley H E, Sciortino F *Phys. Rev. E* **72** 031510 (2005)
 138. Debenedetti P G *J. Phys.: Condens. Matter* **15** R1669 (2003)
 139. Brovchenko I, Oleinikova A, in *11th Intern. Conf. on the Physics, Chemistry of Ice, Abstracts* (Eds F Wilhelms, W F Kuhs) (Bremerhaven, 2006) p. 16
 140. Stanley H E et al. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **363** 509 (2005)
 141. Giovambattista N, Stanley H E, Sciortino F *Phys. Rev. Lett.* **94** 107803 (2005)
 142. Mayer E, Pletzer R *Nature* **319** 298 (1986)
 143. Palumbo M E *J. Phys.: Conf. Ser.* **6** 211 (2005)
 144. Ofengeim D K, Zhmakin A I, in *Computational Science — ICCS 2003: Intern. Conf., Melbourne, Australia and St. Petersburg, Russia, June 2–4, 2003, Proc. Pt. 1* (Lecture Notes in Computing Science, Vol. 2657) (Heidelberg: Springer, 2003) p. 3
 145. Bogdanov M V et al. *Centr. Eur. J. Phys.* **2** 183 (2004)
 146. Eisenberg D, Kauzmann W *The Structure and Properties of Water* (Oxford: Clarendon Press, 1959) [Эйзенберг Д, Кауцман В *Структура и свойства воды* (Л.: Гидрометеоиздат, 1975)]
 147. Erdey-Grúz T *Transport Phenomena in Aqueous Solutions* (New York: Wiley, 1974) [Эрдей-Груз Т *Явления переноса в водных растворах* (М.: Мир, 1976)]
 148. Stanley H E *Pramana* **53** 53 (1999)
 149. Stanley H E et al. *J. Phys.: Condens. Matter* **12** A403 (2000)
 150. Finney J L *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **359** 1145 (2004)
 151. Chaplin M, <http://www.lsbu.ac.uk/water/anmlies.html>

152. Mishima O, Stanley H E *Nature* **396** 329 (1998)
153. Саркисов Г Н УФН **176** 833 (2006) [Sarkisov G N *Phys. Usp.* **49** 809 (2006)]
154. Rasaiah J C, Lynden-Bell R M *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **359** 1545 (2001)
155. Iitaka N, Ebisuzaki T *J. Phys.: Condens. Matter* **16** S1171 (2004)
156. Loveday J S et al. *Nature* **410** 451 (2001)
157. Локотош Т В, Маломуз Н П, Захарченко В Л *ЖСХ* **44** 1085 (2003) [Lokotosh T V, Malomuzh N P, Zakharchenko V L *J. Struct. Chem.* **44** 1011 (2003)]
158. Klein R A, in NIC Symp. 2006: *Proc.* (NIC Ser., Vol. 32, Eds G Münster, D Wolf, M Kremer) (Jülich: John von Neumann Inst. für Computing, 2006) p. 65
159. Ляшенко А К, Дуняшев В С *ЖСХ* **44** 906 (2003) [Lyashenko A K, Duniyashev V S *J. Struct. Chem.* **44** 836 (2003)]
160. Stanley H E et al. *Physica A* **306** 230 (2002)
161. Finney J L *J. Phys.: Conf. Ser.* **57** 40 (2007)
162. Mazza M G et al. *Phys. Rev. Lett.* **96** 057803 (2006)
163. Kolesnikov A I et al. *Phys. Rev. Lett.* **93** 035503 (2004)
164. Sun Q, Zheng H-F *Chinese Phys. Lett.* **23** 3022 (2006)
165. Chaplin M F *Biophys. Chem.* **83** 211 (2000)
166. Stanley H E et al. *J. Stat. Phys.* **110** 1039 (2003)
167. Dill K A et al. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34** 173 (2005)
168. Bowron D T *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **359** 1167 (2004)
169. Evans W, Fish J, Keblinski P, Report. LM-06K008 (Niskayuna, NY: Lockheed Martin Corp., 2006)
170. Ефимов Ю Я *ЖСХ* **42** 1122 (2001)
171. Киров М В *ЖСХ* **42** 958 (2001) [Kirov M V *J. Struct. Chem.* **42** 803 (2001)]
172. Волошин В П и др. *ЖСХ* **46** 451 (2005) [Voloshin V P et al. *J. Struct. Chem.* **46** 438 (2005)]
173. Franzese G et al. *Nature* **409** 692 (2001)
174. Yamada M et al. *Phys. Rev. Lett.* **88** 195701 (2002)
175. Monaco G et al. *Phys. Rev. Lett.* **90** 255701 (2003)
176. Сон Л Д, Автореф. дисс. ... д.-ра физ.-мат. наук (Екатеринбург: УГПУ, 2007)
177. Heremans K *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **38** 1157 (2005)
178. Franzese G, Stanley H E, cond-mat/0603634
179. Kumar P et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** 9575 (2007)
180. Fuchizaki K, Kawasaki K *J. Phys.: Condens. Matter* **14** 12203 (2002)
181. Ryltcev R, Son L *Physica A* **368** 101 (2006)
182. Jagla E A *Brazil. J. Phys.* **34** 17 (2004)
183. Yan Z et al. *Phys. Rev. Lett.* **95** 130604 (2005)
184. Zanotti J-M, Bellissent-Funel M-C, Chen S-H *Europhys. Lett.* **71** 91 (2005)
185. Mamontov E et al. *J. Chem. Phys.* **124** 194703 (2006)
186. Rault J *J. Non-Cryst. Solids* **271** 177 (2000)
187. Jansson H, Swenson J *Eur. Phys. J. E* **12** s51 (2003)
188. Franzese G, Stanley H E *J. Phys.: Condens. Matter* **19** 205126 (2007)
189. Chen S-H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 12974 (2006)
190. Ryabov Y E, Puzenko A, Feldman Y *Phys. Rev. B* **69** 014204 (2004)
191. Matsuda K et al. *Phys. Rev. B* **74** 073415 (2006)
192. Choi E-M et al. *Phys. Rev. Lett.* **95** 085701 (2005)
193. Braslavsky I, Lipson S G *Appl. Phys. Lett.* **72** 264 (1998)
194. Petersen A et al. *Cryobiology* **53** 248 (2006)
195. Petersen A, Rau G, Glasmacher B *Heat Mass Transfer* **42** 929 (2006)
196. Wolfe J, Bryant G, Koster K L *Cryolett.* **23** 157 (2002)
197. Yoog Y, Pope J, Wolfe J *Cryobiology* **46** 271 (2003)
198. Park S, Saven J G *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **60** 450 (2005)
199. Baumgaertner A et al., in NIC Symp. 2004: *Proc.* (NIC Ser., Vol. 20, Eds D Wolf, G Münster, M Kremer) (Jülich: John von Neumann Inst. für Computing, 2003) p. 365
200. Ernst J A et al. *Science* **267** 1813 (1995)
201. Garcia A E, Hummer G *Proteins Struct. Funct. Genet.* **38** 261 (2000)
202. Rand R P *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **359** 1277 (2004)
203. Levy Y, Onuchic J N *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35** 389 (2006)
204. Oleinikova A et al. *Phys. Rev. Lett.* **95** 247802 (2005)
205. Smolin N, Dr. Rer. Nat. Thesis (Dortmund: Univ Dortmund, 2006)
206. Bizzarri A R, Cannistraro S *J. Phys. Chem. B* **106** 6617 (2002)
207. Aman K et al. *Biophys. J.* **84** 102 (2003)
208. Senapati S, Berkowitz M L *J. Chem. Phys.* **118** 1937 (2003)
209. Bostick D L, PhD Thesis (Chapel Hill: Univ. North Carolina, 2004)
210. Cheng Y K, Rossky P J *Nature* **392** 696 (1998)
211. Kumar P et al. *Phys. Rev. E* **72** 051503 (2005)
212. Balasubramanian S K et al. *Phys. Rev. Lett.* **89** 115505 (2002)
213. Henchman R H, McCammon J A *Protein Sci.* **11** 2080 (2002)
214. Balasubramanian S K et al. *Current Sci.* **85** 1571 (2003)
215. Falconi M et al. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **51** 607 (2003)
216. Russo D, Hura G, Head-Gordon T *Biophys. J.* **86** 1852 (2004)
217. Mickan S P et al. *Proc. SPIE* **4937** 49 (2002)
218. Pal S, Balasubramanian S, Bagchi B *J. Chem. Phys.* **120** 1912 (2004)
219. Zhu Y, Granick S *Phys. Rev. Lett.* **87** 096104 (2001)
220. Kozlowski T *Cold Regions Sci. Technol.* **38** 93 (2004)
221. Хименков А Н, Брушков А В *Введение в структурную криологию* (М.: Наука, 2006)
222. Watanabe K et al. *J. Phys.: Condens. Matter* **18** 9375 (2006)
223. Zangi R J *J. Phys.: Condens. Matter* **16** S5371 (2004)
224. Kumar P et al. *Phys. Rev. E* **75** 011202 (2007)
225. Giovambattista N, Rossky P J, Debenedetti P D *Phys. Rev. E* **73** 041604 (2006)
226. Cicero G et al., Technical Report UCRL-JRNL-209874 (2005)
227. Raschke T M, Levitt M *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 6777 (2005)
228. Zewall A *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **364** 315 (2005)
229. Heugen U et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 12301 (2006)
230. Pal S K, Peon J, Zewall A H *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** 1763 (2002)
231. Higgins M J et al. *Biophys. J.* **91** 2532 (2006)
232. Dokter A M, Woutersen S, Bakker H J *J. Chem. Phys.* **126** 124507 (2007)
233. Balasubramanian S K et al. *J. Indian Inst. Sci.* **83** 27 (2003)
234. Wang J, Kalinichev A G, Kirkpatrick R J *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** 3351 (2004)
235. Chen S-H et al. *J. Chem. Phys.* **125** 171103 (2006)
236. Gránásy L *J. Mol. Struct.* **485–486** 523 (1999)
237. Kay J E et al. *Atmos. Chem. Phys.* **3** 1439 (2003)
238. Franks F *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **361** 557 (2003)
239. Hubel A, Norman J, Darr T B *Cryobiology* **38** 140 (1999)
240. Pearce R S *Plant Growth Regulat.* **29** 47 (1999)
241. Sparsk J P, Campbell G S, Black R A *Can. J. For. Res.* **30** 624 (2000)
242. Pham Q T, in *Food Process Modelling* (Eds L M M Tijskens, M L A T M Hertog, B M Nicolai) (Cambridge: Woodhead Publ., 2001) p. 316
243. Akyurt M et al. *Energy Convers. Manag.* **43** 1773 (2002)
244. McKenzie J M, Voss I C, Siegel D I *Adv. Water Res.* **30** 966 (2007)
245. Харакоз Д П *Учен. бюл. хум.* **41** 333 (2001)
246. Bale J S *Eur. J. Entomol.* **93** 369 (1996)
247. Scott K L, Lecak J, Acker J P *Transfus. Med. Rev.* **19** 127 (2005)
248. Lee R E, Jr, Costanzo J P *Annu. Rev. Physiol.* **60** 55 (1998)
249. Brown C L, Bale J S, Walters K F A *Proc. R. Soc. London Ser. B* **271** 1507 (2004)
250. Griffith M et al. *Plant Physiol.* **138** 330 (2005)
251. Smallwood M, Bowles D J *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357** 831 (2002)
252. Cavender-Bares J, in *Vascular Transport in Plant* (Eds N M Holbrook, M A Zwieniecki, P Melcher) (Amsterdam: Elsevier/Acad. Press, 2005) p. 401
253. Storey K B, Storey J M, in *Life in the Frozen State* (Eds B Fuller, N Lane, E E Benson) (Boca Raton: CRC Press, 2004) p. 243
254. Bryant G, Koster K L, Wolfe J *Seed Sci. Res.* **11** 17 (2001)
255. Layne J R, Jr, Jones A L *J. Exp. Zoology* **290** 1 (2001)
256. Margesin R, Neuner G, Storey K B *Naturwissenschaften* **94** 77 (2007)
257. Denlinger D L, Lee R E, in *Temperature Sensitivity in Insects and Application in Integrated Pest Management* (Eds G J Hallman, D L Denlinger) (Boulder: Westview Press, 1998) p. 55
258. Davis P L et al. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357** 927 (2002)
259. Hinch D H *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357** 909 (2002)
260. D'Amico S et al. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357** 917 (2002)
261. Vali G, in *Nucleation and Atmospheric Aerosols, 1996* (Eds M Kulmala, P E Wagner) (Oxford: Pergamon Press, 1996) p. 271
262. Lundheim R *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **359** 937 (2004)
263. Bale J S *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357** 849 (2002)
264. Voituron Y *Am. Naturalist* **160** 255 (2002)
265. Costanzo J P et al. *J. Comp. Physiol. B* **165** 238 (1995)
266. Layne J R (Jr.), Lee R E (Jr.) *Climate Res.* **5** 53 (1995)
267. Storey K B, Storey J M *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27** 365 (1996)
268. Storey K B *Cryobiology* **52** 1 (2006)
269. Wharton D A, Ferns D J *J. Exp. Biol.* **198** 1381 (1995)

270. Breton G et al. *Annu. Rev. Biotechnol.* **6** 57 (2000)
271. Лозина-Лозинский Л К *Очерки по криобиологии* (Л.: Наука, 1972) [Translated into English: Lozina-Lozinskii L K *Studies in Cryobiology* (New York: Wiley, 1974)]
272. Vigh L et al. *Prog. Lipid Res.* **44** 303 (2005)
273. Katschinski D *News Physiol. Sci.* **19** 11 (2004)
274. Kregel K C *J. Appl. Physiol.* **92** 2177 (2002)
275. Панасенко О О, Ким М В, Гусев Н Б *Усп. биол. хим.* **43** 59 (2003)
276. Beck E H et al. *J. Biosci.* **32** 501 (2007)
277. Feder M E, Hofmann G E *Annu. Rev. Physiol.* **61** 243 (1999)
278. Bischof J, He X *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1066** 1 (2005)
279. Devireddy R V et al. *Reproduction*. **124** 643 (2002)
280. Мревлишвили Г М *УФН* **128** 273 (1979) [Mrevlishvili G M *Sov. Phys. Usp.* **22** 433 (1979)]
281. Kundrotas P J, Karshikoff A *Protein Sci.* **11** 1681 (2002)
282. Caldarelli G, de los Rios P *J. Biol. Phys.* **27** 229 (2001)
283. Rose G D, Wolfenden R *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22** 381 (1993)
284. Rees A R, Sternberg M J E *From Cells to Atoms* (Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1984) [Рис Э, Стернберг М *От клеток к атомам* (М.: Мир, 1988)]
285. Wolkers W F et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1768** 728 (2007)
286. Лифшиц И М, Гросберг А Ю, Хохлов А Р *УФН* **127** 353 (1979) [Lifshits I M, Grosberg A Yu, Khokhlov A R *Sov. Phys. Usp.* **22** 123 (1979)]
287. Финкельштейн А В, Птицын О В *Физика белка* (М.: Изд-во МГУ, 2002)
288. Baldwin R L, in *Protein Folding Handbook* (Eds J Buchner, T Kiefhaber) (Weinheim: Wiley-VCH, 2005) p. 3
289. Любарев А Е, Курганов Б И *Усп. биол. хим.* **40** 43 (2000)
290. Wolfe J, in *Encyclopedia of Life Sciences* (London: Nature Publ. Group, 2002) p. 1
291. Mukherjee P K, Bhattacharya J *J. Chem. Phys.* **126** 024901 (2007)
292. Сонин А С *УФН* **153** 273 (1987) [Sonin A S *Sov. Phys. Usp.* **30** 875 (1987)]
293. Singer S J, Nicolson G L *Science* **175** 720 (1972)
294. Bryant G, Wolfe J *Eur. Biophys. J.* **16** 369 (1989)
295. Wada H *J. Phys. Soc. Jpn.* **72** 3142 (2003)
296. Ni D et al. *J. Biol. Phys.* **32** 369 (2006)
297. Kumar P B, Gompper G, Lipowsky R *Phys. Rev. E* **60** 4610 (1999)
298. Гросберг А Ю, Хохлов А Р *УФН* **149** 723 (1986) [Grosberg A Yu, Khokhlov A R *Sov. Phys. Usp.* **29** 797 (1986)]
299. Rheistädter M C, Seydel T, Demmel F *Phys. Rev. E* **71** 061908 (2005)
300. Bischof J C *Heat Mass Transfer* **42** 955 (2006)
301. Антонов В Ф, Смирнова Е Ю, Шевченко Е В *Липидные мембраны при фазовых превращениях* (М.: Наука, 1992)
302. Chakrabarty J et al. *Cryobiology* **54** 27 (2007)
303. Lovelock J E *Biochim. Biophys. Acta* **10** 414 (1953)
304. Гринштейн С В, Кост О А *Усп. биол. хим.* **41** 77 (2001)
305. Bald W B, Fraser J *Rep. Prog. Phys.* **45** 1381 (1982)
306. Wolfe J, Bryant G *Cryobiology* **39** 103 (1999)
307. Gránásy L et al. *Philos. Mag.* **86** 3757 (2006)
308. Шибков А А и др. *Кристаллография* **46** 549 (2001) [Shibkov A A et al. *Crystogr. Rep.* **46** 496 (2001)]
309. Curry M R, Millar J D, Watson P F *Biol. Reprod.* **51** 1014 (1994)
310. Güémez J, Fiolhais C, Fiolhais M *Eur. J. Phys.* **23** 83 (2002)
311. Baker M B, Baker M *Geophys. Res. Lett.* **31** L19102 (2004)
312. Morris G E *Human Reprod.* **21** 2075 (2006)
313. Mazur P J. *Gen. Physiol.* **47** 347 (1963)
314. Kedem O, Katchalsky A *Biochim. Biophys. Acta* **27** 229 (1958)
315. Kargol M *Cell. Mol. Biol. Lett.* **7** 983 (2002)
316. Kargol M, Kargol A *Gen. Physiol. Biophys.* **22** 51 (2003)
317. Batycky R P, Hammerstedt R, Edwards D A *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **355** 2459 (1997)
318. de Freitas R C, Diller K R *Cell Preserv. Technol.* **2** 19 (2004)
319. Studholme C V, MS Thesis (Univ. of Alberta, 1997)
320. Ateshian G A, Likhitanichkul M, Hung C T *J. Biomech.* **39** 464 (2006)
321. Pushkar N S et al. *Cryobiology* **13** 147 (1976)
322. Carnevale K A, MS Thesis (Georgia Inst. Techn., 2004)
323. Mazur P, Pinn I L, Kleinhaus F W *Cryobiology* **54** 223 (2007)
324. Tharasanit T, Colenbrander B, Stout T A E *Reproduction* **129** 789 (2005)
325. Barbee K *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1066** 1 (2005)
326. Toner M, Cravalho E G, Karel M M *J. Appl. Phys.* **67** 1582 (1990); Erratum: **70** 4653 (1991)
327. Karlsson J O M, Cravalho E G, Toner M J. *J. Appl. Phys.* **75** 4442 (1994)
328. Withers L A, Davey M R *Protoplasma* **94** 207 (1978)
329. Edelhauser H F et al. *Invest. Ophthalmol.* **10** 100 (1971)
330. Han B, Bischof J C *Cryobiology* **48** 8 (2004)
331. Mullen S F, Rosenbaum M, Critser J K *Cryobiology* **54** 281 (2007)
332. Mazur P *Am. J. Physiol.* **247** 125 (1984)
333. Tanghe A et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** 3377 (2004)
334. Mazur P J. *Gen. Physiol.* **39** 869 (1956)
335. Souza H, Mazur P *Biophys. J.* **23** 89 (1978)
336. Lovelock J E, Bishop M W H *Nature* **183** 1394 (1959)
337. Пушкарь Н С и др. *Криопротекторы* (Киев: Наукова думка, 1978)
338. Stacy R et al. *Cryobiology* **52** 99 (2006)
339. Eroglu A et al. *Nature Biotechnol.* **18** 163 (2004)
340. Strambini G B, Gabellini E *Biophys. J.* **70** 971 (1996)
341. Thirumala S et al. *Nanotechnology* **18** 195104 (2007)
342. Бизунок С Н, Свентицкий Е Н, в сб. *Вода в биологических системах и их компонентах* (Л.: Изд-во ЛГУ, 1983) с. 45
343. Дюбло Т С *Вісник Харківського націон. унів. ім. В.Н. Каразіна. Сер.: біологія* 221 (2006)
344. Giraud M N et al. *Human Reprod.* **15** 2160 (2000)
345. Lenné T et al., in *Cryo 2006: 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Hamburg, Germany, July 24–27, 2006*, Abstract Book (2006) p. 136
346. Yu Z-W, Quinn P J *Biochim. Biophys. Acta* **1509** 440 (2000)
347. Pfaff R T et al. *Mol. Human Reprod.* **4** 51 (1998)
348. Gilmore J A et al. *Human Reprod.* **15** 335 (2000)
349. Devireddy R V et al. *Biol. Reprod.* **61** 664 (1999)
350. Choi J H, Han B, Bischof J C, in *ASME Intern. Mechanical Engineering Congress, Anaheim, USA*, (2004) p. 1
351. Mazur P, Koshimoto C *Biol. Reprod.* **66** 1485 (2002)
352. Zinchenko Y, Laureano E, Coger R B *Cell Preserv. Technol.* **2** 276 (2004)
353. Guenther et al. *Cryobiology* **52** 401 (2006)
354. Веденов А А, Левченко Е Б *УФН* **141** 3 (1983) [Vedenov A A, Levchenko E B *Sov. Phys. Usp.* **26** 747 (1983)]
355. Yong Y H, Pope J M, Wolfe J *Biophys. J.* **74** 1949 (1998)
356. Graether S P et al. *Nature* **406** 325 (2000)
357. Du N, Liu X Y, Hew Ch L *J. Biol. Chem.* **278** 36000 (2003)
358. Bouvet V, Ben R E *Cell Biochem. Biophys.* **39** 133 (2003)
359. Nguyen D T et al. *Biopolymers* **75** 109 (2004)
360. Chen G, Jia Z *Biophys. J.* **77** 1602 (1999)
361. Matsumoto S et al. *Cryobiology* **52** 90 (2006)
362. Robles V et al. *Theriogenology* **68** 284 (2007)
363. Cheng C -H C, in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)* (Ed. C Gerday) (London: EOLSS Publ., 2003)
364. Radhakrishnan R, Trout B L *Phys. Rev. Lett.* **90** 158301 (2003)
365. Strom C S, Liu X Y, Jia Z *J. Biol. Chem.* **279** 32407 (2004)
366. Hoffmann N E, Bischof J C *Urology* **60** (Suppl. 2A) 40 (2002)
367. Braslavsky I, Lipson S G J. *Cryst. Growth* **198/199** 56 (1999)
368. van Saarloos W *Phys. Rep.* **386** 29 (2003)
369. Peppin S S L et al. *Proc. R. Soc. London Ser. A* **463** 723 (2007)
370. Tada Y et al., in *Cryo 2006: 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Hamburg, Germany, July 24–27, 2006*, Abstracts Book (2006) p. 165
371. Rempel A W, Worster M G J. *Cryst. Growth* **223** 420 (2001)
372. Dumont F, Marechal P-A, Gervais P *Cryobiology* **46** 33 (2003)
373. Pearce R S, Willison J H M *Planta* **163** 295 (1985)
374. Arav A et al. *Mol. Cell. Endocrin.* **187** 77 (2002)
375. Jiao A et al. *Cryobiology* **52** 386 (2006)
376. Steif P S, Palastro M C, Rabin Y *Med. Eng. Phys.* **29** 661 (2007)
377. El-Danasouri I, Selman H *Middle East Fertil. Soc. J.* **10** 205 (2005)
378. Mullen S F, PhD Thesis (Univ. Missouri-Columbia, 2007)
379. Bakken A M *Current Stem Cell Res. Therapy* **1** 47 (2006)
380. Fahy G M et al. *Cryobiology* **48** 22 (2004)
381. Chao N-H et al. *Aquat. Living Resour.* **7** 99 (1994)
382. Thompson K A et al. *J. Andrology* **22** 339 (2001)
383. Coticchio G et al. *Human Reprod.* **21** 1771 (2006)
384. Boutron P J. *Phys. Chem.* **87** 4273 (1983)
385. Katkov I I, Levine F *Cryobiology* **49** 62 (2004)
386. Starr F W, Angell C A, Stanley H E *Physica A* **323** 51 (2003)
387. Giovambattista N et al. *Phys. Rev. Lett.* **93** 047801 (2004)

388. Karlsson J O M *Cryobiology* **42** 154 (2001)
389. Vigier G, Thollet G, Vassoille R J. *Cryst. Growth* **84** 309 (1987)
390. Bronstein V L, Steponkus P L *Cryobiology* **32** 1 (1995)
391. Diller K R et al. *Med. Biol. Eng. Comput.* **14** 321 (1976)
392. Diller K R J. *Biomech. Eng.* **127** 67 (2005)
393. Gage A A, Baust J *Cryobiology* **37** 171 (1998)
394. Acker J P, McGann L E *Cryo-Lett.* **19** 367 (1998)
395. Acker J P et al. *Cryobiology* **38** 363 (1999)
396. Acker J P, McGann L E *Cryobiology* **40** 54 (2000)
397. Acker J P, Elliot J A W, McGann L E *Biophys. J.* **81** 1389 (2001)
398. Armitage W J, Juss B K *Cryobiology* **46** 194 (2003)
399. Berger W K, Uhrig B *Experientia* **52** 843 (1996)
400. Kleinhans F W et al. *Cryobiology* **52** 128 (2006)
401. Edashige K et al., in *Cryo 2006: 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Hamburg, Germany, July 24–27, 2006*, Abstracts Book (2006) p. 50
402. Tajkhorshid E et al., in *Bacterial Ion Channels and their Eukaryotic Homologues* (Eds A Kubalski, B Martinac) (Washington, DC: ASM Press, 2005) p. 153
403. Tajkhorshid E et al., in *Handbook of Materials Modeling Vol. I Methods and Models* (Ed. S Yip) (Berlin: Springer, 2005) p. 1797
404. Irimia D, Karlsson J O M *Biophys. J.* **82** 1858 (2002)
405. Muldrew K, McGann L E *Biophys. J.* **57** 525 (1990)
406. Steponkus P L et al. *J. Membrane Biol.* **85** 191 (1985)
407. Workman E L, Reynolds S E *Phys. Rev.* **78** 254 (1950)
408. Wettlaufer J S *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **357** 3403 (1999)
409. Имянитов И М, Шифрин К С *УФН* **76** 593 (1962) [Imyanitov I M, Shifrin K S *Sov. Phys. Usp.* **5** 292 (1962)]
410. Гудзенко О И и др. *ЖТФ* **55** 612 (1985) [Gudzenko O I et al. *Sov. Phys. Tech. Phys.* **30** 362 (1985)]
411. De Bruin K A, Krassowska W *Biophys. J.* **77** 1213 (1999)
412. Smith K C, Neu J C, Krassowska W *Biophys. J.* **86** 2813 (2004)
413. Tarek M *Biophys. J.* **88** 4045 (2005)
414. Toner M et al. *J. Membrane Biol.* **115** 261 (1990)
415. Muldrew K, McGann L E *Biophys. J.* **66** 532 (1994)
416. Beney L et al. *Biochem. Eng. J.* **9** 205 (2001)
417. Balasubramanian S K, Bischof J C, Hubel A *Cryobiology* **52** 62 (2006)
418. Wu H-L, Ma Y, Peng X-F *Chinese Phys. Lett.* **21** 345 (2004)
419. Korniski B, Darr T B, Hubel A *Cryobiology* **38** 339 (1999)
420. Liu B L et al. *African J. Biotechnol.* **5** 2014 (2006)
421. de Freitas R C et al. *Cryobiology* **35** 230 (1997)
422. Do G-S et al. *Int. J. Refrigerat.* **27** 184 (2004)
423. Kerr W L et al. *Sci. Horticulturae* **69** 169 (1997)
424. Sanz P D et al. *Meat Sci.* **52** 275 (1999)
425. James S J, James C *Meat Refrigeration* (Boca Raton, FL: CRC Press/Woodhead Publ., 2002)
426. Lillford P J, Holt C B *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **357** 945 (2002)
427. Schäfer A Th, Kauffmann J D *Forensic Sci. Int.* **102** 149 (1999)
428. Caro C G et al. *The Mechanics of the Circulation* (Oxford: Oxford Univ. Press, 1978) [Каро К и др. *Механика кровообращения* (М.: Мир, 1981)]
429. Liu Z et al. *Phys. Rev. E* **67** 061602 (2003)
430. Liu Z et al. *Phys. Rev. E* **69** 021611 (2004)
431. Thakrar R R et al. *FASEB J.* **20** 874 (2006)
432. Armentano R A et al. *Cryobiology* **52** 17 (2006)
433. Rabin Y, Plitz J *Ann. Biomed. Eng.* **33** 1213 (2005)
434. Isachenko V et al. *Biol. Reprod.* **71** 1167 (2004)
435. Lamaita R M et al. *J. Assist. Reprod. Gen.* **22** 105 (2005)
436. Rabin Y, Taylor M J, Wolmark N J. *Biomech. Eng.* **120** 259 (1998)
437. Xu Y. et al. *J. Biomech.* (Available online 8 June 2007)
438. Bishof J C et al. *Cryobiology* **34** 42 (1997)
439. Zhang A et al. *Phys. Med. Biol.* **51** 6047 (2006)
440. Venkatasubramanian R T et al. *Ann. Biomed. Engineer.* (published online 18 April 2006)
441. Mala T *Minimally Invasive Therapy* **15** 9 (2006)
442. Yiu W-k et al. *Int. J. Angiol.* **14** 237 (2006)
443. Theodorescu D *Rev. Urology* **6** (Suppl 4) S9 (2004)
444. Brey E M et al. *Microvasc. Res.* **63** 279 (2002)
445. Craciunescu O et al. *Adv. Heat Mass Transf. Biotech., HTD* **363** 9 (1999)
446. Abraham J P, Sparrow E M *Int. J. Heat Mass Transfer* **50** 2537 (2007)
447. Stańczyk M, Telega J J *Acta Bioeng. Biomech.* **4** 31 (2002)
448. Khaled A R A, Vafai K *Int. J. Heat Mass Transfer* **46** 4989 (2003)
449. Pennes H H J. *Appl. Physiol.* **1** 93 (1948)
450. Baish J W J. *Biomech. Eng.* **116** 521 (1994)
451. Chato J C J. *Biomech. Eng.* **102** 110 (1980)
452. Chen M M, Holmes K R *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **335** 137 (1980)
453. Dagan Z, Weinbaum S, Jiji L M J. *Biomech. Eng.* **108** 89 (1986)
454. Charny C K, Weinbaum S, Lewin R L J. *Biomech. Eng.* **112** 80 (1990)
455. Wissler E H J. *Appl. Physiol.* **85** 35 (1998)
456. Weinbaum S, Jiji L, Lemons D E J. *Biomech. Eng.* **106** 331 (1984)
457. Weinbaum S, Jiji L M J. *Biomech. Eng.* **107** 131 (1985)
458. Shrivastava D, Roemer R B *Phys. Med. Biol.* **50** 3627 (2005)
459. Preusser T et al., in *Proc. Simul., Visual. (SimVis)* (Magdeburg, 2005)
460. Лойцянский Л Г *Механика жидкости и газа* 3-е изд. (М.: Наука, 1970) [Translated into English: Loitsyanskiy L G *Mechanics of Liquids and Gases* (New York: Begeell House, 1995)]
461. Deng Z-S, Liu J, in *Computational and Information Science: First Intern. Symp., CIS 2004, Shanghai, China, December 16–18, 2004: Proc.* (Lecture Notes in Computer Science, Vol. 3314) (Heidelberg: Springer, 2004) p. 437
462. Zhang Y T, Liu J, Zhou Y X *Forsch. Ingenier.* **67** 188 (2002)
463. Shih T-C et al. *Int. Comm. Heat Mass Transfer* **30** 975 (2003)
464. Deng Z-S, Liu J *Num. Heat Transfer A* **49** 47 (2006)
465. Lubashevsky I, Gafiychuk V, adap-org/991101
466. Jiang S C et al. *Burns* **28** 713 (2002)
467. Waldron H A *Phys. Med. Biol.* **25** 323 (1980)
468. Reed K L, Brown T D, Conzemius M G J. *Biomech.* **36** 1317 (2003)
469. Deng Z - S et al. *Int. J. Thermal Sci.* (Available online 29 June 2007)
470. Baust J G, Gage A A *BJU Int.* **95** 1187 (2005)
471. Rui J et al. *Breast Cancer Res. Treat.* **53** 185 (1999)
472. Larson T R et al. *Urology* **55** 547 (2000)
473. Шноль Э Э и др. *Метод молекулярной динамики в физической химии* (М.: Наука, 1996)
474. Шайтан К В, Сарайкин С С "Молекулярная динамика", <http://www.moldyn.ru/library/md/default.htm>
475. Hansson T et al. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **12** 190 (2002)
476. Enthel P et al. *Lect. Notes Phys.* **642** 177 (2004)
477. Perić M, Schäfer M, Schreck E, in *Parallel Computational Fluid Dynamics'92* (Eds R B Pelz, A Ecer, J Häuser) (Amsterdam: North-Holland, 1992) p. 311
478. Levin E I, Zhmakin A I, in *Parallel Virtual Machine — EuroPVM'96* (Lecture Notes in Computer Science, Vol. 1156) (Heidelberg: Springer, 1996) p. 270
479. Schlick T et al. *J. Comput. Phys.* **151** 9 (1999)
480. *A Science-Based Case for Large-Scale Simulation* Vol. 2 (Washington, DC: US Dept. Energy, Office of Sci., 2004)
481. Ji L, MS Thesis (Florida State Univ., 2006)
482. Phillips J C et al. *J. Comput. Chem.* **26** 1781 (2005)
483. Sanbonmatsu K Y, Tung C S J. *Struct. Biol.* **157** 470 (2007)
484. Petcu D et al. *Scalable Comput.: Practice, Exper.* **7** 15 (2006)
485. "Molecular Dynamics Machine", <http://atlas.riken.go.jp/mdm/index.html>
486. Jorgensen W L et al. *J. Comput. Phys.* **79** 926 (1983)
487. Levitt M et al. *J. Phys. Chem.* **101** 5051 (1997)
488. Bushev Y G, Davletbaeva S V, Muguet F *Molecules* **8** 226 (2003)
489. Yu H, van Gunsteren W F J. *Chem. Phys.* **121** 9549 (2004)
490. Todorova T, Seitsonen A P, Hutter J, UCRL-JRNL-215365 (2005)
491. Vega C et al. *J. Phys.: Condens. Matter* **17** S3238 (2005)
492. Fernández R G et al. *J. Chem. Phys.* **124** 144506 (2006)
493. Nygård K et al. *Phys. Rev. E* **74** 031503 (2006)
494. Matsumoto M, Saito S, Ohmine I *Nature* **416** 409 (2002)
495. Moreno A J et al. *Phys. Rev. Lett.* **95** 157802 (2005)
496. Sciortino F et al. *Eur. Phys. J. E* **9** 233 (2002)
497. Scala A et al. *Phys. Rev. E* **62** 8016 (2000)
498. Radhakrishnan R, Trout B L J. *Am. Chem. Soc.* **125** 7743 (2003)
499. Carignano M A, Shepson P B, Szleifer I *Mol. Phys.* **103** 2957 (2005)
500. Vrbka L, Jungwirth P *Phys. Rev. Lett.* **95** 148501 (2005)
501. Vrbka L, Jungwirth P J. *Mol. Liquids* **134** 54 (2007)
502. Kim K S et al. *Proc. R. Soc. London Ser. A* **461** 273 (2005)
503. Berendsen H J C, Marrink S J *Pure Appl. Chem.* **65** 2513 (1993)
504. Schmid F et al., in *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins* (NIC Ser., Vol. 23, Eds N Attig et al.) (Jülich: John von Neumann Inst. für Computing, 2004) p. 323

505. Mouritsen O G et al., in *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins* (NIC Ser., Vol. 23, Eds N Attig et al.) (Jülich: John von Neumann Inst. für Computing, 2004) p. 347
506. Jiang Y, Kindt J T *J. Chem. Phys.* **126** 045105 (2007)
507. Li X, Hassan S A, Mehler E L *Proteins: Struct., Function, Bioinform.* **60** 464 (2005)
508. Brannigan G, Lin L C L, Braun F L H *Eur. Biophys. J.* **35** 104 (2006)
509. Dill K A *Biochem.* **24** 1501 (1985)
510. Stillinger F H, Head-Gordon T *Phys. Rev. E* **52** 1852 (1995)
511. Chen M, Huang W-q *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **7** 7 (2006)
512. Buzano C, De Stefanis E, Pretti M J *J. Chem. Phys.* **126** 074904 (2007)
513. Marqués M I et al. *Phys. Rev. Lett.* **91** 138101 (2003)
514. Muguruma C, Okamoto Y, Mikami M *El. J. Mol. Design* **1** 583 (2002)
515. Cheng A, Merz K M *Biophys. J.* **73** 2851 (1997)
516. Baardsnes J et al. *Protein Sci.* **10** 2566 (2001)
517. Jorov A, Zhorov B S, Yang D S C *Protein Sci.* **13** 1524 (2004)
518. Kai L et al. *Frontiers Biology China* **2** 180 (2007)
519. Lerbret A et al., cond-mat/0503579
520. Branca C et al. *Phys. Scripta* **64** 390 (2001)
521. Pasenkiewicz-Gierula M et al. *Acta Biochim. Polon.* **47** 601 (2000)
522. Pinisetty D, MS Thesis (Louisiana State Univ., 2005)
523. Рабинович А Л, в сб. *Труды XIII Всерос. конф. "Структура и динамика молекулярных систем" ("Яльчик-2006")* (2006)
524. Millar C, PhD Thesis (Glasgow, 2003)
525. Millar C, Asenov A, Roy S J. *Comput. Theor. Nanoscience* **2** 1 (2005)
526. Zhu F, Schulten K *Biophys. J.* **85** 236 (2003)
527. Hilt M, Pesch W, Zimmermann W, in *NIC Symp. 2004: Proc.* (NIC Ser., Vol. 20, Eds D Wolf, G Münster, M Kremer) (Jülich: John von Neumann Inst. für Computing, 2003) p. 453
528. Lee B W et al., physics/0407083; *Fluid Phase Equilib.* **225** 63 (2004)
529. Zhang A et al. *Cryobiology* **47** 143 (2003)
530. Karlsson O M *Cryobiology* **48** 357 (2004)
531. Irimia D, Karlsson J O M *Biophys. J.* **88** 647 (2005)
532. Stott S L, Karlsson J O M, in *Summer Bioeng. Conf., Sonesta Beach Resort, FL* (2003) p. 196
533. Sumpter M L, MS Thesis (Georgia Inst. Techn., 2004)
534. Carin M, Jaeger M *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **16** 231 (2001)
535. Jaeger M, Carin M J. *Comput. Phys.* **179** 704 (2002)
536. Mao L et al. *Int. J. Heat Mass Transfer* **46** 5123 (2003)
537. Udaykumar H S, Mao L *Int. J. Heat Mass. Transfer* **45** 4793 (2002)
538. Liu Z et al. *Finite Elem. Anal. Design* **40** 1641 (2004)
539. Hu H, Argyropoulos A *Modell. Simul. Mater. Sci. Eng.* **4** 371 (1996)
540. Wilson S B, Spence V A *Phys. Med. Biol.* **33** 895 (1988)
541. Durkee J W, Jr, Antich P P, Lee C E *Phys. Med. Biol.* **35** 847 (1990)
542. Durkee J W, Jr, Antich P P *Phys. Med. Biol.* **36** 1377 (1991)
543. Durkee J W, Jr, Antich P P *Phys. Med. Biol.* **36** 345 (1991)
544. Shih T-C *Med. Eng. Phys.* **29** 946 (2007)
545. Shrivastava D, Roemer R *Int. J. Heat Mass Transfer* **48** 4090 (2005)
546. Cooper T E, Trezek G J *Cryobiology* **7** 79 (1970)
547. Deng Z-S, Liu J *Eng. Anal. Bound. Elem.* **28** 97 (2004)
548. Wan R et al. *Comp. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **6** 197 (2003)
549. Egorov Yu E, Zhmakin A I *Comput. Mat. Sci.* **11** 204 (1998)
550. Egorov Yu E, Galyukov A O, Zhmakin A I *LNCSE* **8** 267 (1999)
551. Жмакин А И, Офенгейм Д Х *Письма в ЖТФ* **32** (17) 66 (2006) [Zhmakin A I, Ofengeim D Kh *Tech. Phys. Lett.* **32** 765 (2006)]
552. Жмакин А И, Офенгейм Д Х, в сб. *Вопросы математической физики и прикладной математики* (Под ред. Э А Троппа, Е В Галактионова) (СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 2007) с. 196
553. Fortin A, Belhamadia Y *Comput. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **8** 241 (2005)
554. Belhamadia Y, Fortin A, Chamberland É J. *Comput. Phys.* **194** 233 (2004)
555. Belhamadia Y, Fortin A, Chamberland É J. *Comput Phys.* **201** 753 (2004)
556. Филиппов Ю П, Васильков А П *Инж.-физ. журн.* **36** 1100 (1979)
557. Yu T H, Zhou Y X, Liu J *Int. J. Thermophys.* **24** 513 (2003)
558. Mala T, MD Thesis (Oslo: Univ. Oslo, 2003)
559. Nakamura R et al., in *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention — MICCAI 2004* (Lecture Notes in Computer Science, Vol. 3217) (Heidelberg: Springer, 2004) p. 542
560. Zlochiver S, Rosenfeld M, Abboud S *Ann. Biomed. Eng.* **33** 616 (2005)
561. Otten D M, Rubinsky B *Physiol. Meas.* **26** 503 (2005)
562. Edd J F, Rubinsky B *Physiol. Meas.* **27** S175 (2006)
563. Albu A B et al., in *Surgery Simulation and Soft Tissue Modeling* (Lecture Notes in Computer Science, Vol. 1273) (Heidelberg: Springer, 2003) p. 121
564. Иваницкий Г Р *УФН* **176** 1293 (2006) [Ivanitskiy G R *Phys. Usp.* **49** 1263 (2006)]
565. Симонов Е Н *Рентгеновская компьютерная томография* (Снежинск: Изд. РФЯЦ – ВНИИТФ, 2003)
566. Bischof J C et al. *Ann. Biomed. Eng.* **35** 292 (2007)
567. Tacke J et al. *Am. J. Neuroradiol.* **22** 431 (2001)
568. Мэнсфилд П *УФН* **175** 1044 (2005); Mansfield P (Sir) *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** 5456 (2004)
569. Choi B et al. *J. Biomed. Optics* **9** 282 (2005)
570. Sandison G A *Phys. Med. Biol.* **43** 3309 (1998)
571. Mala T et al. *Cryobiology* **43** 268 (2001)
572. Rabin Y *Cryobiology* **46** 109 (2003)
573. Rabin Y *Cryo-Lett.* **21** 163 (2000)
574. Rabin Y, Stahovich T F *Cryo-Letters* **23** 361 (2002)
575. Kaatz U *Phys. Med. Biol.* **35** 1663 (1990)
576. Ling G *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **36** 1 (2004)
577. Pham D C, Torquato S J. *Appl. Phys.* **94** 6591 (2003)
578. Orpwood R D *Phys. Med. Biol.* **26** 555 (1981)
579. Sandison G A *Urology* **60** (Suppl 2A) 50 (2002)
580. Rabin Y et al. *Techn. Cancer Res. Treatment* **3** 229 (2004)
581. Lung D C et al. *Comp. Meth. Biomech. Biomed. Eng.* **7** 101 (2004)
582. Segino M et al. *Reproduction* **130** 187 (2005)
583. Pfaff R T et al. *Biol. Reprod.* **63** 1294 (2000)
584. Jeremias E et al. *Fertil. Steril.* **79** 651 (2003)
585. Toner M et al. *Biophys. J.* **64** 1906 (1993)
586. Morris G J, Acton E, Avery S *Human Reprod.* **14** 1013 (1999)
587. Alber M, Nüsslin F *Phys. Med. Biol.* **44** 479 (1999)
588. Thiebaut C, Lemonnier D *Int. J. Thermal Sci.* **41** 500 (2002)
589. Malinen M, Huttunen T, Kaipio J P *Phys. Med. Biol.* **48** 745 (2003)
590. Baissalov R et al. *Phys. Med. Biol.* **46** 1799 (2001)
591. Rossi M R et al. *Comput. Meth. Prog. Biomed.* **85** 41 (2007)

Physical aspects of cryobiology

A.I. Zhmakin

*Ioffe Physico-Technical Institute, Russian Academy of Sciences,
ul. Politekhnicheskaya 26, 194021 St.-Petersburg, Russian Federation
Tel. (7-812) 292-7145
Fax (7-812) 297-1017
E-mail: ai@zhmakin.ru*

Physical phenomena during biological freezing and thawing processes at the molecular, cellular and tissue levels are examined. Basics of cryosurgery and cryopreservation are presented. Existing cryobiological models, including numerical ones, are reviewed.

PACS numbers: **44.05 + e**, **81.10. – h**, 87.15.Aa, 87.54.Br

DOI: 10.3367/UFN.0178.200803b.0243

Bibliography — 591 references

Received 1 August 2007, revised 12 October 2007

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **178** (3) 243–266 (2008)

Physics – Uspekhi **51** (3) (2008)