

УДК 57.043:577.112

О.А. Нардид

Влияние низких температур на белковые системы

UDC 57.043:577.112

O.A. Nardid

Effect of Low Temperatures on Protein Systems

Реферат: В обзоре освещены основные проблемы сохранения структурно-функциональных свойств изолированных и находящихся в составе биологических тканей белков в условиях гипотермии и криогенных температур. Обсуждаются роль дегидратации биомакромолекул вследствие вымораживания воды в криповреждении белков при замораживании-отогреве; особенности низкотемпературной денатурации белков, обусловленной энтропийной природой гидрофобных взаимодействий. Описаны криповреждения биомакромолекул, их обратимость с точки зрения роли воды в структурной нестабильности охлажденных или замороженных биополимеров. Рассмотрены потенциальные пути криозащиты биомакромолекул при замораживании.

Ключевые слова: низкие температуры, биомакромолекулы, дегидратация, структурно-конформационные нарушения, криозащита.

Реферат: В огляді висвітлено основні проблеми збереження структурно-функціональних властивостей ізольованих білків і білків у складі біологічних тканин в умовах гіпотермії й криогенних температур. Обговорюються роль дегідратації біомакромолекул у результаті виморожування води в крипошкодженні білків при заморожуванні-відігріві; особливості низкотемпературної денатурації білків, обумовленої ентропійною природою гідрофобних взаємодій. Описані крипошкодження біомакромолекул, їх зворотність із погляду на роль води в структурній нестабільності охолоджених або заморожених біополімерів. Розглянуто потенційні шляхи криозахисту біомакромолекул при заморожуванні.

Ключові слова: низькі температури, біомакромолекули, дегідратація, структурно-конформаційні порушення, криозахист.

Abstract: The review concerns the main issues of preserving the structure and function of proteins either isolated or as a part of biological tissues during hypothermic and cryogenic storage. The role of biomacromolecules' dehydration, as a consequence of water freeze-out in proteins cryodamage during freeze-thawing is discussed, as well as peculiarities of protein low-temperature denaturation, associated with entropic nature of hydrophobic interactions. Low temperature injuries in biomacromolecules, their reversibility with considering the role of water in structure instability of cooled or frozen biopolymers are described. Potential ways to protect biomacromolecules during freezing are considered.

Key words: low temperatures, biomacromolecules, dehydration, structural and conformational changes, cryoprotection.

Для усовершенствования существующих и создания новых криобиологических технологий необходимо знание физико-химических процессов, происходящих в биообъектах при криоконсервировании и определяющих конформацию отдельных биомакромолекул, а следовательно их стабильность, надмолекулярную организацию и, в итоге, функциональную активность [3, 4, 30]. Изменения, как минимум, третичной и четвертичной конформации белка после замораживания-отогрева зависят от условий, в которых находились биомакромолекулы на разных этапах криоконсервирования. Такое проявление воздействия низких температур обусловлено тем, что при замораживании-отогреве как гидрофобные взаимодействия, так и водородные связи, определяющие и стабилизирующие третичную и четвертичную структуры, могут нарушаться в зависимости от состава, ионной силы,

To improve the existing and create novel cryobiological techniques the knowledge of physical and chemical processes occurring in bioobjects during cryopreservation is needed, as well as determining the conformation of isolated biomacromolecules and therefore their stability, supra-molecular organization and finally their functional activity [6, 9, 83]. The changes of at least protein tertiary and quaternary conformations post freeze-thawing depend on the conditions under which the biomacromolecules were at different cryopreservation stages. Such a manifestation of the effect of low temperatures is stipulated by the fact that during freeze-thawing both hydrophobic interactions and hydrogen bonds which determine and stabilize tertiary and quaternary structures may be disordered depending on the composition, ionic strength, dielectric constant and medium pH. During temperature decrease especially below free water crystallization

Отдел криобиофизики, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: olnard@mail.ru

Поступила 03.12.2013
Принята в печать 27.02.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 83–101.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiophysics, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: olnard@mail.ru

Received December 3, 2013
Accepted February 27, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(2): 83–101.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

диэлектрической постоянной и рН среды. При понижении температуры, особенно ниже точки кристаллизации свободной воды, важным фактором является падение ее потенциала или активности до уровня, при котором дальнейшее полноценное функционирование биологических структур невозможно. Кроме того, существуют и другие факторы: замедление скорости реакций при низких температурах, ограничение диффузии веществ и т. п.

В последнее время большое внимание уделяется исследованию естественных белковых смесей с физиологическими концентрациями белков и составом среды: плазмы или сыворотки крови, фолликулярной жидкости, белковых экстрактов различных биологических тканей и т. п. Такие растворы часто используют в клинических целях [11, 12, 29, 36, 48, 111]. Например, сыворотку кордовой крови (СКК) человека, которая содержит более 60 специфических белков, пептиды, витамины и микроэлементы широко применяют для коррекции и лечения патологических состояний человека. Длительное же ее хранение возможно только в условиях низких температур [10, 29, 32].

Понимание явлений, протекающих при замораживании-отогреве биологических объектов, поможет установить основные причины повреждения биомолекул и предупредить их возникновение.

Ранее считалось, поскольку белки-ферменты, выделенные из охлажденных до температур ниже 0°C и отогретых тканей животных сохраняли свою активность, то такие белки обладали криоустойчивостью. Однако последующие исследования в области криобиохимии и криобиофизики показали существенное разрушительное влияние низких температур на активность ферментов, если среда, в которой они находятся, не нивелирует действие низких температур (рис. 1). Состояние изолированных белков, особенно с четвертичной структурой, могут изменяться уже при 4°C, поскольку охлаждение до этих температур влияет на некоторые физико-химические свойства воды, например на ее плотность и вязкость, вследствие чего может отличаться первоначальная нативная конформация белковой глобулы. Такие трансформации сопровождаются нарушениями внутримолекулярных взаимодействий активных участков биополимера, что влияет на его функции [114]. Эти нарушения заключаются в изменении жесткости полипептидных цепей белка и пространственного расположения отдельных его участков. Методы радиоспектроскопии позволяют наблюдать такие трансформации нативной структуры каталитических белков при температуре около 0°C и, как следствие, ингибирование их функции [55]. Имеются многочислен-

point an important factor is a decrease of its potential or activity down to the level at which the further normal function of biological structures is impossible. In addition there are other factors: slowing down of the rate of reactions at low temperatures, limited diffusion of substances *etc.*

Much attention has been paid recently to the study of natural protein mixtures with physiological concentrations of proteins and medium composition: blood serum plasma, follicular fluid, protein extracts of various biological tissues *etc.* These solutions are frequently used with clinical aims [24, 44, 45, 76, 85, 107]. For instance, human cord blood serum (CBS) containing more than 60 specific proteins, peptides, vitamins and microelements is widely applied to correct and treat human pathologies. Its long-term storage is possible only under conditions of low temperatures [43, 76, 79].

Understanding the phenomena proceeding during freeze-thawing of biological objects will help to establish the causes of damages of biomacromolecules and to prevent their appearance.

It was thought previously, that due to the fact that enzyme proteins isolated from cooled down to subzero temperatures and thereafter thawed animal tissues preserve their activity, these proteins are cryoresistant. However, further cryobiochemical and cryobiophysical studies have shown a destructive effect of low temperatures on activity of enzymes, if the medium where they are present does not balance the effect of low temperatures (Fig. 1). The state of isolated proteins especially those possessing quaternary structure may change even at 4°C, since the cooling down to these temperatures affect several physical and chemical properties of water, *e. g.* its density and viscosity, and as a consequence a primary native conformation of protein globule may differ. These transformations are accompanied by the disorders of intramolecular relationships of active sites of biopolymer, affecting its functions [112]. These disorders consist in the change of rigidity of protein polypeptide chains and spatial location of some sites. Radiospectroscopy methods enable to observe these transformations of native structure of catalytic proteins at above zero temperature and as a consequence their function inhibiting [102]. There are numerous data about so-called cold inactivation of some oligomeric proteins. Dissociation to subunits after cooling down to 0°C was noted in glucose-6-phosphate-dehydrogenase of erythrocytes, carbomoyl phosphate synthetase, adenosine triphosphatase [29, 30, 113], pyruvate carboxylase [100], ribulose-1,5-biphosphate-carboxylase-oxygenase [15]. These enzymes can be set against other proteins (*e. g.* urease and 17-oxysteroid dehydrogenase), cooling of which is accompanied with aggregation, accompanied with an altered structure of subunits [113].



ные данные о так называемой холодной инактивации ряда олигомерных белков. Диссоциация на субъединицы после охлаждения до 0°C была отмечена у глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы эритроцитов, карбамоилфосфатсинтетазы, аденозинтрифосфатазы [7, 72, 73], пируваткарбоксилазы [105], рибозо-1,5-бифосфат-карбоксилазы-оксигеназы [62]. Этим ферментам можно противопоставить другие белки (например, уреазу и 17β-оксистероид-дегидрогеназу), которые претерпевают при охлаждении агрегацию, сопровождающуюся изменением структуры субъединиц [7].

Многочисленны исследования влияния на белки более низких температур. Существенному пересмотру была подвергнута гипотеза о неповреждающем действии низких температур на белковые системы [13, 50, 99]. Установлено, что при замораживании изолированных белков до более низких температур и последующем отогреве наблюдаются агрегация [60], а также изменение конформации – разрыхление белковой глобулы [100]. Отмечено, что замораживание-отогрев отдельных белков (глюкозооксидазы, цитохром-оксидазы, сывороточного альбумина) с использованием низких скоростей (1–7 град/мин) нарушает внутримолекулярные взаимодействия в биомолекулах и влияет на их конформацию, а именно разрыхляет поверхностные полипептидные цепи [30]. Смещение полосы Амид I в сторону больших частот от 1644 до 1649 см⁻¹ и отсутствие изменений в области 1615 см⁻¹ для бычьего сывороточного альбумина свидетельствуют о дегидратации биомолекул, связанной с их агрегацией в результате замораживания-отогрева при сохранении вторичной структуры [16]. Криолабильность белков, в том числе и мембранных, зависит от уровня их надмолекулярной организации (в растворе, составе мембран, клеток, тканей). Быстрое замораживание (до –196°C) в буферных растворах без значительной потери специфических функций хорошо переносят простые белки (рибонуклеаза, пепсин, трипсин, химотрипсин), имеющие устойчивую конформацию за счет S–S сшивок полипептидной цепи [106, 119]. Однако вследствие многократного замораживания и медленного отогрева активность ферментов снижается. После быстрого замораживания под защитой глицерина такие гидролитические ферменты, как липаза, амилаза, трипсин и химотрипсин хорошо и длительно сохраняются даже при неблагоприятных температурах от –20 до –25°C [28, 115]. После замораживания сложных белков с четвертичной структурой криповреждения проявляются в большей степени. В церулоплазмине и гаптоглобине после низкотемпературного воздействия наблюдались статистически значимые нарушения структурных и функциональных

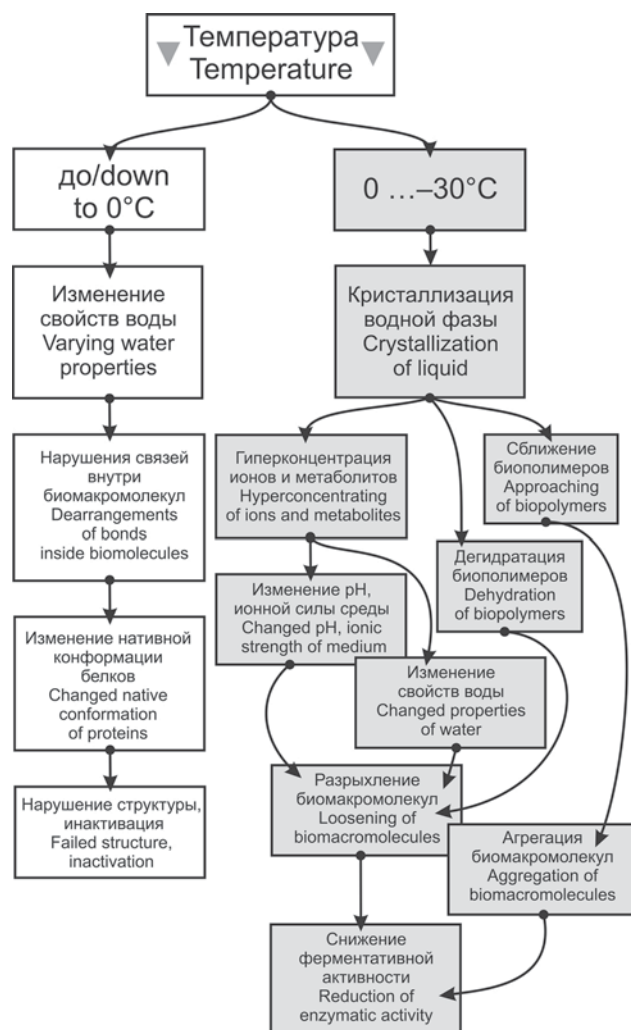


Рис. 1. Реакция биополимеров на понижение температуры.

Fig. 1. Reaction of biopolymers to decrease of temperature.

There are plenty of the studies concerning the effect on proteins of much lower temperatures. A hypothesis about non-damaging effect of low temperatures on protein systems was significantly revised [20, 27, 91]. It has been noted that freeze-thawing of some proteins (glucose oxidase, cytochrome oxidase, serum albumin) using low rates (1–7 deg/min) impaired the intramolecular interactions in biomacromolecules and affected their conformation, in terms of loosening of superficial polypeptide chains [84]. Shifting of Amide I band towards higher frequencies from 1,644 to 1,649 cm⁻¹ and the absence of changes in the area of 1,615 cm⁻¹ for bovine serum albumin testified to dehydration of biomacromolecules related to their aggregation due to freeze-thawing, whilst the secondary structure was preserved [63]. Cryolability of proteins including the membrane ones depends on the level of their supra-molecular organization (in the solution, as a part of

свойств [39]. После замораживания-отогрева водных растворов бычьего сывороточного альбумина наблюдали агрегацию отдельных биомолекул, которая интерпретируется как образование межмолекулярных S–S связей, или полную денатурацию белка [68, 71]. Образование дисульфидных сшивок было также отмечено при исследовании действия замораживания на структуру лактатдегидрогеназы [21]. Под влиянием глубокого охлаждения могут образовываться гибридные комплексы ферментов [51, 52]. Химические процессы, протекающие в водных растворах полимеров при низких температурах, обусловлены силами, возникающими при изменении агрегатного состояния воды. При этом могут происходить разрывы цепей макромолекул с появлением свободных радикалов, а при размораживании – образовываться новые связи и молекулы, отличающиеся от первоначальных [53]. В результате замораживания-отогрева смеси двух фракций изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ1 и ЛДГ5) происходила диссоциация фермента на субъединицы, а впоследствии осуществлялась спонтанная рекомбинация с образованием гибридных изоферментов. Показано появление трех дополнительных изоферментных фракций с промежуточной электрофоретической подвижностью по отношению к исходным формам [96]. Образование гибридных изоферментных форм, обусловленное внутримолекулярными нарушениями в исходных белках, чаще всего наблюдается при медленных или многократных режимах замораживания до -30 или -70°C , когда концентрирование солей и метаболитов проявляет свое максимальное повреждающее действие на биомолекулы. Вместе с тем, если лактатдегидрогеназу замораживать со скоростью $300\text{--}400$ град/мин до -196°C в бессолевом растворе, то гибридизация не происходит [96]. Методом электрофореза установлена гибридизация лизоцима, рибонуклеазы, смеси лизоцима и рибонуклеазы под действием замораживания [51], а также подтверждена криогибридизация лак-татдегидрогеназы [61]. В некоторых работах [52, 61] также были отмечены гибридизация и криоагрегация белков, хотя данные литературы о характере криоповреждений биомолекул во многом противоречивы.

В результате замораживания-отогрева в разной степени повреждались в растворе и тканях цитохромоксидаза (ЦХО), цитохром P-450 и транспортные белки [2, 46, 98]. J. K. Sherman [107] показал, что после медленного замораживания ткани сердца крысы и изолированных митохондрий снижается активность цитохромоксидазы. Э.И. Обозная и соавт., изучая влияние двухэтапного замораживания на клетки костного мозга, также выявили снижение активности этого фермента [40]. Данный

membranes, cells, tissues). Simple proteins (ribonuclease, pepsin, trypsin, chymotrypsin) possessing a stable conformation provided by S–S cross-linking of peptide chains tolerate well a rapid freezing (down to -196°C) in buffer solutions without significant loss of specific functions [103, 119]. However, multiple freezing and slow thawing result in a reduction of the enzymatic activity. After rapid freezing under protection of glycerol such hydrolytic enzymes as lipase, amylase, trypsin and chymotrypsin could be preserved well for a long period even at unfavorable temperatures from -20 to -25°C [76, 115]. After freezing of complex proteins with quaternary structure the cryodamages are manifested in a greater extent. Ceruloplasmin and haptoglobin affected by low temperature had a statistically significant impairments of structural and functional properties [89]. Freeze-thawing of aqueous solutions of bovine serum albumin led to either an aggregation of some biomacromolecules which was interpreted as the formation of molecule-molecule S–S bonds or a complete protein denaturation [21, 29]. Formation of disulphide cross-links was also observed when investigating the effect of freezing on structure of lactate dehydrogenase [66]. The effect of deep freezing was also in terms of formation of hybrid complexes of enzymes [58, 59]. Chemical processes proceeding in aqueous solutions of polymers at low temperatures are stipulated by the forces appearing due to altered aggregate state of water. Herewith, the ruptures of macromolecule chains can occur with the appearance of free radicals, and later during thawing there could be formed new bonds and molecules, differing from initial ones [14]. Freeze-thawing of mixtures of two fractions of isoenzymes of lactate dehydrogenase (LDG1 and LDG5) resulted in the dissociation of the enzyme to subunits and thereafter in a spontaneous recombination with the formation of hybrid isoenzymes. The appearance of three additional isoenzyme fractions with an electrophoretic mobility being intermediate as for initial forms has been shown [70]. Formation of hybrid forms stipulated with intermolecular impairments in initial proteins was often observed after performing slow or multiple freezings down to -30 or -70°C when the concentration of salts and metabolites manifest their maximal damaging effect on biomacromolecules. Moreover, if lactate dehydrogenase was frozen in a saline with the rate of $300\text{--}400$ deg/min down to -196°C , no hybridization was found [70]. Electrophoresis method was applied to find hybridization of lysozyme, ribonuclease, mixture of lysozyme and ribonuclease due to freezing effect [57], as well as to confirm the cryohybridization of lactate dehydrogenase [13]. Some investigators [15, 59] reported hybridization and cryoaggregation of proteins, though the published data about the character of cryodamages of biomacromolecules are largely quite contradictory.



гемсодержащий белок соединен с цитозольной поверхностью внутренней мембраны слабыми электростатическими связями [108], что обеспечивает его высокую латеральную подвижность в мембране [70]. Считают, что изменение активности цитохромного участка дыхательной цепи – чувствительный тест холодового повреждения митохондрий [75, 76]. При этом отмечается корреляция между скоростью замораживания и изменением данного участка активности.

Существует мнение, что охлаждение влияет на молекулярную архитектуру и фазовое состояние липидного компонента мембран, что может приводить к повреждениям ферментов, входящих в состав биологических мембран [2, 98]. При исследовании влияния замораживания-отогрева на митохондрии в среде, содержащей сахарозу, N. Araki отметил резкое снижение активности α -кетоглютаратдегидрогеназы [58]. Активность этого фермента во многом определяется состоянием окружающих мембранных липидов, и ее снижение наблюдается после эквilibрации образцов в зоне температуры фазовых переходов последних, в то время как изменение активности цитохром-*c*-редуктазы и цитохром-*c*-оксидазы в подобных условиях не наблюдается [57]. W. Wino и V. Unicode, изучая влияние замораживания до -20°C на изолированный липопротеиновый комплекс цитохромоксидазы, отметили ингибирование активности фермента, которое с увеличением количества циклов замораживания-отогрева увеличивалось [116]. После замораживания-отогрева митохондрий в среде, содержащей KCl, W. N. Fishbein и J. L. Griffin обнаружили уменьшение активности цитохром-*c*-редуктазы [75].

Снижение ферментативной активности каталитических белков после замораживания-отогрева, вплоть до $(52 \pm 4)\%$ для ЦХО и до $(72 \pm 3)\%$ для глюкозооксидазы, зависит от скорости охлаждения и солевого состава среды и является результатом изменения конформации белка, вследствие которого наблюдалось увеличение степени гидрофобности в области активного центра [30]. Кроме того, замораживание и последующий отогрев ЦХО приводили к уменьшению размеров липопротеинового комплекса в результате отщепления части ассоциированных с белком липидов. О том, что процедура замораживания-отогрева дестабилизировала структуру фермента, свидетельствовали снижение устойчивости ЦХО к нагреву (плавление начиналось при более низких температурах) и сдвиг в область более низких температур предденатурационного конформационного перехода. S. Kawato и соавт. показали, что этот переход обусловлен конформационными изменениями белковой части и не зависит от количества и свойств,

Cytochrome oxidase (CO), cytochrome P-450 and transport proteins being frozen-thawed in a solution and in tissues were damaged in a different extent [6, 78, 110]. Sherman [103] has shown that after slow freezing of rat heart tissue and isolated mitochondria the activity of cytochrome oxidase decreases. Oboznaya *et al.* [90] also found the reduction of this enzyme activity when studying the effect of two-stage freezing on bone marrow cells. This heme-containing protein is bound with cytosol surface of the inner membrane by means of weak electrostatic bonds [105], that provides its high lateral mobility inside membrane [28]. Changes in activity of cytochrome site of respiratory chain is considered to be a sensitive test of mitochondria cold damage [31, 33]. Herewith, the correlation between the rate of freezing and change in the activity of this site is noted.

There is a notion that cooling affects molecular architecture and phase state of lipid component of membranes, that may lead to a damage of enzymes being the components of biological membranes [6, 77]. Investigation of the effect of freeze-thawing on mitochondria in the medium containing sucrose conducted by Araki revealed a sharp reduction of the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase [4]. The activity of this enzyme is mainly determined by the state of environmental membrane lipids and its reduction is observed after equilibration of the samples in the temperature zone of phase transitions of the latter, whilst no alteration in the activity of cytochrome-*c*-reductase and cytochrome-*c*-oxidase under similar conditions is observed [3]. Wino and Unicode investigated the effect of freezing down to -20°C in isolated lipoprotein complex of cytochrome oxidase and observed the inhibiting of enzyme activity which increased after multiple freeze-thawing cycles [115]. Fishbein and Griffin have found a decreased activity of cytochrome-*c*-reductase after freeze-thawing mitochondria in KCl-containing medium [32].

A decrease in enzymatic activity of catalytic proteins after freeze-thawing down to $(52 \pm 4)\%$ and $(72 \pm 3)\%$ was revealed in CO and glucose oxidase, respectively, that was found to depend on cooling rate and solutes composing the medium, and was associated with a change in protein conformation, resulted in an increase in hydrophobicity in the vicinity of the active center [83]. Moreover, freezing and subsequent thawing of CO led to a decrease in lipoprotein complex dimensions as a result of detaching some protein-associated lipids. The fact that freeze-thawing procedure destabilized the enzyme structure was confirmed by a reduced resistance of CO to heating (melting began at lower temperatures) and a shift of pre-denaturation conformational transition towards lower temperatures. Kawato *et al.* showed this transition as stipulated by conformational changes in a protein part of the complex



связанных с белком липидов [93]. Снижение ферментативной активности ЦХО в результате криоповреждения фермента объяснялось изменением конформации внутри белковой глобулы, нарушающим взаимодействие между двумя гемами, без диссоциации после низкотемпературного воздействия димеров ЦХО на мономеры [45].

Исходя из данных литературы относительно влияния низких температур на белки (как изолированные, так и входящие в состав биологических систем), можно предположить, что белки с четвертичной структурой наиболее криолабильны [7, 21, 52]. Однако наличие криорезистентных белков с четвертичной структурой свидетельствует о частичной универсальности этого наблюдения. Во многих случаях не установлена степень обратимости обнаруженных изменений структурно-функциональных свойств ферментов после замораживания и последующего отогрева [87, 90, 115]. Основные закономерности криоповреждения белков в цикле замораживания-отогрева подробно изучались П. Дузу [13] на примере растворимых и мембраносвязанных ферментов с разной молекулярной структурой и мембранной локализацией. Механизм структурных изменений белковых макромолекул под влиянием низких температур представляет особый интерес, поскольку его можно использовать для раскрытия природы молекулярной организации и функционирования биомолекул с четвертичной структурой. Окончательно вопрос о взаимосвязи между молекулярной организацией каталитических белков и криолабильностью или криорезистентностью до настоящего времени не решен. Возможно новые экспериментальные данные как в криобиологических, так и в общепроцессных областях помогут прояснить ситуацию.

Процесс криоденатурации белков, который проявляется в потере структурного состояния нативной белковой молекулы под влиянием холода, в отличие от высокотемпературной денатурации, управляем, а при использовании криопротекторов возникает возможность еще в большей степени сохранить свойства биомолекул при замораживании [3]. В случае замораживания белков в изолированном виде наблюдается повреждающее действие низких температур, проявляющееся в обратимой денатурации биомолекул [109, 113]. Возможность низкотемпературной денатурации белков определяется энтропийной природой гидрофобных взаимодействий, которые в глобулярных белках образуют основную систему внутримолекулярных кооперативных связей [91]. При этом необходимо отметить, что анализ существующей литературы по данной проблеме подтверждает необходимость дальнейших исследований термодинамики низкотемпературной денатурации, по-

and not dependent on a number and properties of protein-associated lipids [55]. Decrease in CO enzymatic activity as a result of enzyme cryodamage was explained by a change in the conformation inside protein globule, disordering the interaction between two hemes without dissociation of CO dimers into monomers following low temperature exposure [97].

Basing on the published data on the low temperature effect on proteins (both isolated and being the part of biological systems), one can assume proteins with quaternary structure to be the most cryolabile [58, 69, 113]. However, the presence of cryoresistant proteins with quaternary structure indicates only a partial universalism of this observation. In many cases the limits of reversibility of the revealed changes in structural and functional properties of enzymes after freezing and following thawing were not established [49, 52, 114]. Basic regularities of protein cryodamages during freeze-thawing cycle were studied in details by Duzu [20] in soluble and membrane-bound enzymes with different molecular structure and membrane localization. Of special interest is the mechanism of structural changes in protein macromolecules under low temperature effect, because of the possibility to use it for revealing the nature of molecular organization and functioning of biological macromolecules with quaternary structure. The question about the relationship between molecular organization of catalytic proteins and cryolability/cryoresistance has not been finally resolved yet. It is possible, that new experimental data obtained both in cryobiological and general biological fields would help to clarify the situation.

The process of protein cryodenaturation, manifested in a loss of structural state of native protein molecule under cold effect, in contrast to high temperature denaturation is a controlled one, and in case of using cryoprotectants there is the possibility to preserve to a greater extent the properties of biological macromolecules during freezing [6]. In case of protein freezing in isolated form a damaging effect of low temperatures was observed, manifested in a reversible denaturation of biological macromolecules [105, 109]. The possibility of low temperature denaturation of proteins is determined by an entropic nature of hydrophobic interactions, which form the basic system of intramolecular cooperative interactions in globular proteins [53]. It should be noted that the analysis of current relevant publications confirms the need for further studies of thermodynamics of low temperature denaturation, because of difference of this process from usual thermal denaturation [46].

Glycoproteins of some poikilotherms, cold-adapted fish in particular, were established to be not only cryostable, but capable to be antifreeze proteins [49, 101]. Up to now there are not enough data on glycoproteins, especially of homoiotherms not adapted to



сколькx этот процесс отличается от обычной тепловой денатурации [84].

Установлено, что гликопротеиды некоторых пойкилотермов, в частности рыб, адаптированных к холоду, являются не только криостабильными, но и могут играть роль антифризных белков [87, 106]. До настоящего времени не получено достаточного количества данных относительно гликопротеидов, в частности теплокровных животных, не адаптированных к холоду, поэтому утверждения, что гликопротеиды любой природы криорезистентны безосновательны.

Охлаждение биологических суспензий до температуры фазового перехода растворителя сопровождается физико-химическими процессами, которые могут оказывать повреждающее влияние на структуру и функцию белков. В литературе описаны физико-химические явления, протекающие при замораживании-отогреве биологических суспензий на уровне межмолекулярных взаимодействий [9, 14]. Установлено, что повреждающее воздействие на биомолекулы при замораживании могут оказывать такие процессы, как концентрирование солей и других компонентов раствора при вымораживании основной массы свободной воды, изменение межмолекулярных взаимодействий и pH среды (рис. 1). Совокупность этих факторов получила общее название «эффекты раствора». Поскольку указанные физико-химические изменения взаимообусловлены и являются следствием вымораживания воды, то их влияние на биомолекулы, по существу, комплексное. Несмотря на данный факт, авторы некоторых работ пытаются оценить вклад в криоповреждение отдельных процессов. Например, изучалась роль эффектов повышения концентраций солей при вымораживании свободной воды. Ионы солей в растворе оказывают влияние на белки в основном путем электростатического взаимодействия с полярными аминокислотными остатками, находящимися на поверхности белковой молекулы. При высоких концентрациях ионов может проявляться эффект, связанный с их гидратными свойствами. При изучении влияния замораживания-отогрева на конформацию изолированной ЦХО методами дифференциальной температурно-пертурбационной спектrophотометрии Е.Д. Розанова и Е.И. Науменко [37, 45] показали, что активность фермента существенно зависит от солевого состава среды. Так, если средой замораживания служил фосфатный буфер, то значимого снижения активности фермента после отогрева не наблюдалось. В трис-буфере или в фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl, активность фермента после замораживания-отогрева уменьшалась почти в 2 раза. Авторы показали, что инактивация

cold, so the assertions that glycoproteins of any nature are cryoresistant have no basis.

Cooling of biological suspensions down to the temperature of solvent phase transition is followed by some physical and chemical processes, likely possessing a damaging effect on protein structure and function. There are the publications concerning physical and chemical phenomena occurring during freeze-thawing of biological suspensions at the level of molecular interactions [40, 120]. Such processes as concentrating of salts and other solutes during freeze-out of a bulk free water, as well as the changes in molecular interactions and pH of medium were established as capable to cause a damaging effect on biological macromolecules during freezing (Fig. 1). The combination of these factors has been generally defined as the 'solution effects'. Since the mentioned physical and chemical changes are interdependent and result from water freeze-out, their effect on biological macromolecules is substantially complex. Despite this fact, some authors attempt to assess the contribution of individual processes to cryodamage. For example, there was studied the role of effects of salt concentration rise during free water freeze-out. Salt ions interact with proteins in a solution mainly through electrostatic interactions with polar amino acid residues located on protein molecule surface. If the ions are highly concentrated the effect associated with their hydrate properties may appear. When studying the effect of freeze-thawing on conformation of isolated CO by the methods of temperature-perturbation differential spectrophotometry Rozanova E.D. and Naumenko E.I. [86, 97] showed the enzyme activity as significantly dependent on the medium salt composition. In particular, if phosphate buffer was a freezing medium, no significant decrease in enzyme activity had been observed. After freeze-thawing in Tris buffer or in phosphate buffer containing 0.15 mol NaCl the enzyme activity decreased two-fold. The authors showed that enzyme inactivation occurred within the range of $-20...-30^{\circ}\text{C}$ after the CO was affected by concentrated saline solutions following freeze-out of free water. It was found also that CO inhibition was stipulated by conformational changes in the vicinity of active center, manifested in higher accessibility of solvent to the heme areas.

High concentrations of some cations and anions which are normally present in low concentrations and required to maintain the structure and function of protein may cause a damage effect. Such ions as F^{-} , NO_3^{-} , Cl^{-} , Br^{-} are able to interact with copper cation inside a protein globule [69]. Similar results after rapid freezing were obtained by H. Beintert *et al.* who studied by EPR the interaction of anions with cytochrome oxidase hemes in cavities inside a molecule



фермента происходит в диапазоне $-20...-30^{\circ}\text{C}$ в результате действия на ЦХО концентрированных растворов солей после вымораживания свободной воды. При этом установлено, что ингибирование ЦХО обусловлено изменением конформации в зоне активного центра, которое проявлялось в большей доступности растворителя к гемовым областям.

Высокие концентрации некоторых катионов и анионов, которые в небольших концентрациях необходимы для поддержания структуры и функции белка, могут оказывать повреждающее действие. Такие ионы, как F^- , NO_3^- , Cl^- , Br^- , способны взаимодействовать с катионом меди, который находится внутри белковой глобулы [22]. Аналогичные результаты после быстрого замораживания были получены Н. Weinert и соавт. при изучении методом ЭПР взаимодействия анионов с гемами цитохром-оксидазы, расположенными в полостях внутри молекулы [59]. S.P. Sun и соавт. наблюдали изменение третичной и четвертичной структур сывороточного альбумина быка в растворах с концентрацией LiCl выше 4 М [110]. Необратимые конформационные изменения иммуноглобулинов под действием солей NaCl , KCl , NaBr происходят при концентрации выше 2–4 М [25, 27], а денатурация сывороточного альбумина быка – при концентрации NaCl 4,6 М [26]. Процессы рекристаллизации, происходящие при отогреве, дополнительно увеличивают повреждающее действие гиперконцентрации солей на биомолекулы (рис. 2) [18, 69].

Анализ литературы свидетельствует о том, что в низкотемпературном повреждении белков с четвертичной структурой существенными являются такие изменения параметров среды, как концентрирование солей в эвтектической области температуры и снижение pH. Наличие концентрированного солевого раствора, который формируется в микрофазах затвердевшей матрицы, уже достаточно для распада белка на субъединицы [13, 85], как и изменения только pH для дестабилизации белков с четвертичной структурой [41]. Разная растворимость неорганических солей, в том числе и входящих в состав буферных растворов, в процессе замораживания может влиять на значительный сдвиг pH, причем при использовании растворов фосфатных буферов соли калия сдвигают pH меньше, чем соли натрия [60, 63, 81]. Для замораживания ферментов применяют буферные растворы на основе молекул-цвиттерионов, поскольку изменение pH при кристаллизации водной фазы с охлаждением таких растворов незначительно [77]. При этом причиной повреждения биомолекул может быть концентрирование нейтральных солей [45].

Изучалась роль эффектов дегидратации биомолекул в повреждающем действии низких

[5]. S.P. Sun *et al.* observed the change of tertiary and quaternary structures of bovine serum albumin in the solutions with concentration of LiCl higher than 4 М [106]. Irreversible conformational changes of immunoglobulins under effect of NaCl , KCl , NaBr occurred under concentrations higher than 2–4 М [72, 74], and denaturation of bovine serum albumin was found at NaCl concentration of 4.6 М [73]. Recrystallization processes during thawing additionally aggravate a damaging effect of salt hyperconcentrations on biomolecules (Fig. 2) [21, 64].

Analysis of publications shows that such changes of medium parameters as concentrating of salts in the eutectic temperature range as well as decreased pH are significant agents of low temperature damage of proteins with quaternary structure. The presence of concentrated saline formed in microphases of solid matrix is sufficient for proteolysis [20, 47] and the changes of solely pH is enough for destabilization of proteins with quaternary structure [90]. Various solubility of inorganic salts including the ones constituting buffer solutions can cause a significant shift in pH

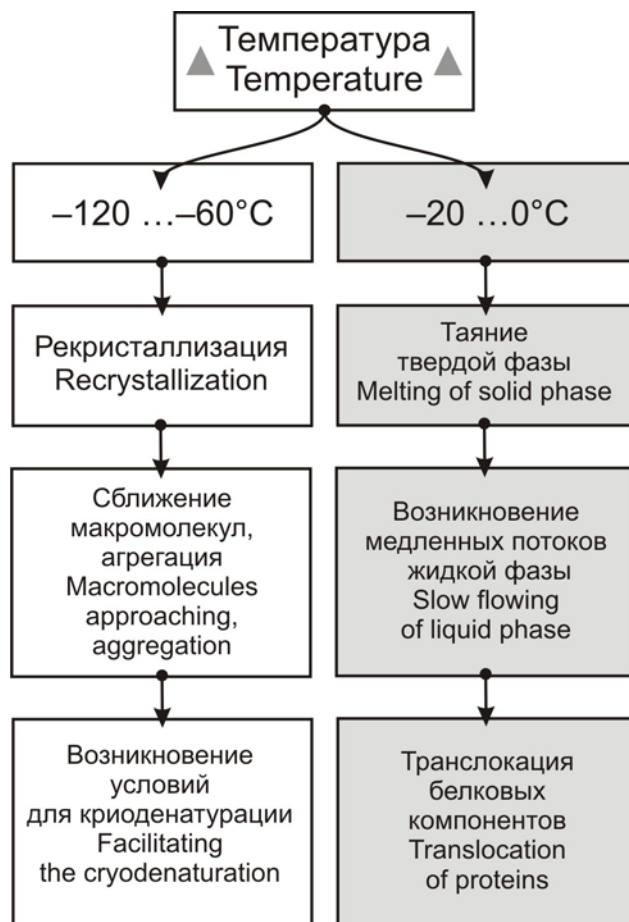


Рис. 2. Реакция биополимеров на отогрев после замораживания.

Fig. 2. Reaction of biopolymers to heating post freezing.



температур [82, 83]. Дегидратация биомакромолекул вследствие вымораживания воды, связанной с белком, может существенно влиять на криоповреждение белков при замораживании и последующем отогреве [24, 54, 103]. Было исследовано изменение гидратации при действии замораживания на каталазу и пероксидазу, при этом показано, что дегидратация является причиной криоповреждений [64, 65]. Особенности дегидратации при повреждении белковых систем в результате замораживания-отогрева широко изучались на ферментах [19, 20, 64, 65, 88]. Было обнаружено, что характер инактивации ферментов примерно однотипен. Это дало основание считать дегидратацию биомакромолекул причиной криоповреждения каталитических белков [1, 53].

Как показали Е.А. Пермаков и соавт. [101], понижение температуры растворов белков от 0 до -196°C вызывает резкие ступенчатые сдвиги спектров триптофановой флуоресценции. При этом у белков с внутренними триптофановыми остатками эти сдвиги происходят в диапазоне $-2\dots-90^{\circ}\text{C}$, а у белков, имеющих только внешние триптофано-вые остатки, – при $20\dots 0^{\circ}\text{C}$ [5]. При исследовании высушенного до небольшой остаточной влажности белка описанный эффект исчезает, а при увлажнении – появляется.

На основании результатов измерений изотерм адсорбции Ю.И. Хургин установил существование нескольких фракций связанной с белком воды [53]. Данный факт описан и в более поздних работах, в которых использовались такие методы, как ядерный магнитный резонанс, температурно-пертурбационная спектроскопия, сканирующая калориметрия и высушивание коллоидного раствора [8, 43, 44, 47]. Первая фракция воды находится на отдаленном расстоянии от поверхности биополимеров или компонентов мембран, характеризуется высокой подвижностью молекул и является метаболически активной. Она обеспечивает транспорт веществ и метаболитов, катализ и другие функциональные процессы. Вторая фракция менее подвижна, расположена ближе к поверхности биополимера, локализована в гидрофобных карманах либо других извитых канальцах, существующих около поверхности биомолекул. Считается, что вторая фракция имеет более сложную структуру, чем первая, и состоит из клатратгидратов или полиморфнольдоподобных систем. Третья фракция воды, составляющая би- и мономолекулярный слой, прочно связана непосредственно с поверхностью биомолекул за счет сил взаимодействия с заряженными группировками белка [13]. По мере удаления от поверхности биополимера, переходя от третьей к первой фракции, подвижность молекул воды, как и температура ее кристаллизации, увеличиваются.

during freezing, particularly, the potassium salts in phosphate-buffered salines shift pH less, than sodium salts [12, 16, 39]. To freeze enzymes one use buffer solutions based on zwitterion molecules since pH changes occurred during crystallization of aqueous phase in the course of cooling of these solutions is insignificant [34]. In this case, the concentrating of neutral salts could cause the biomacromolecules damage [97].

The biomacromolecules dehydration was studied to reveal its part in damaging effect of low temperatures [41, 42]. Biomacromolecules dehydration due to freeze-out of protein-bounded water can significantly affect the protein cryodamage during freezing and following thawing [14, 71, 98]. The changes in hydration during freezing was investigated in catalase and peroxidase, and dehydration was shown to be the cause of cryoinjuries [17, 18]. Dehydration peculiarities in damage of protein systems after freeze-thawing were thoroughly studied in enzymes [17, 18, 50, 65, 66]. The character of enzyme inactivation was revealed to be of similar type. This allowed to consider dehydration of biomacromolecules as the cause of cryoinjuries in catalytic proteins [2, 59].

Е.А. Permakov *et al.* [95] showed that cooling of protein solutions from 0 down to -196°C induced sharp stepwise shifts in the spectra of tryptophan fluorescence. In particular, in proteins with internal tryptophan residues these shifts occurred within the range of $-2\dots-90^{\circ}\text{C}$, while in proteins containing only external tryptophan residues they were found at $20\dots 0^{\circ}\text{C}$ [10]. If the protein was dried to some remnant moisture the described effect disappeared, but after moisturizing it appeared again.

Based on the measured adsorption isotherms Yu.I. Khurgin found the existence of several fractions of protein-bound water [59]. This fact was described also in later researches which utilized the methods of nuclear magnetic resonance (NMR), temperature-perturbation spectrophotometry, scanning calorimetry and drying of colloid solution [37, 93, 96, 110]. The first water fraction is found at a remote distance from biopolymers or membrane components surface, it is characterized by a high mobility of molecules and as possessing metabolic activity. It provides a transport of substances and metabolites, catalysis and other functional processes. The second fraction is less mobile, it is located closer to biopolymer surface, in hydrophobic pockets or other convoluted tubules near biomolecules surface. It is believed that the second fraction has more complicated structure than the first one and consists of clathrate hydrates and polymorphic ice-like systems. The third water fraction forms bi- and monomolecular layer and it is tightly bound immediately with biomolecules surface due to the forces of interactions with the charged protein groups



Исследования методами ЯМР и ЭПР спиновых меток показывают, что вблизи молекул белков существует слой воды толщиной 0,5–0,6 нм, микровязкость которого в 2–3 раза выше, чем у свободной фракции воды [17, 23]. Прочность связи молекул фракций связанной воды с молекулами биополимеров важна в формировании и поддержании нативной структуры биомакромолекул и их функционирования в живых системах [1, 49]. Охлаждение, низкотемпературное воздействие значительно изменяют структуру воды, фракции которой участвуют в стабилизации конформации биополимеров. Важной термодинамической особенностью воды, связанной с поверхностью биополимера фракции воды, является ее более низкая температура плавления по сравнению со свободной водой, которая в дальнейшем продолжает снижаться по мере дегидратации белка [78, 79]. Считается, что фракции воды, локализованные вблизи поверхности или в замкнутых полостях биополимеров, при замораживании имеют размытую зону кристаллизации, охватывающую температурный диапазон от 0 до -70°C и даже до -80°C [3, 17]. Еще до более низких температур (-120 или -130°C) сохраняется подвижность молекул в прочно фиксированном би- или мономолекулярном слое воды.

Данными литературы подтверждено существование молекул воды, связанных с внутренней поверхностью белковой глобулы [38, 92]. Кроме того установлено, что время корреляции ориентационной релаксации такой воды соответствует времени корреляции вращательной релаксации белков [6, 101]. Это является свидетельством того, что в глубоких полостях белковой глобулы находится прочносвязанная с молекулой белка вода.

Как отмечалось выше, при охлаждении и особенно при замораживании свойства воды, поддерживающей в физиологических условиях нативную конформацию биомакромолекул, подвержены значительным изменениям [1, 14, 49]. Поэтому важным для понимания механизмов криоповреждений, их обратимости в цикле криоконсервирования, а также для разработки средств и подходов криозащиты является определение роли воды в структурной стабильности/нестабильности охлажденных до 0°C или замороженных до небольших отрицательных температур биополимеров. Для белковой глобулы в воде равновесие сил, поддерживающих ее нативную конформацию, достигается благодаря расположению определенного числа гидрофобных групп не только внутри, но и на поверхности белковой глобулы [89, 94, 95, 102], наличию молекул воды внутри макромолекул [38, 92]. Равновесие сил осуществляется также благодаря двойственному характеру воздействия воды на структуру белка: стабилизирующему (за счет гидрофобных взаимо-

[20]. When moving from the biopolymer surface with transiting from the third into the first fraction the mobility of water molecules as well as its crystallization temperature increase. Spin label NMR and EPR showed that there is a layer of 0.5–0.6 nm water around the protein molecules, its microviscosity is 2–3 times higher than the one of free water fraction [8, 63]. The bonding strength in the fractions of water associated with biopolymer molecules is essential in formation and maintenance of native structure of biomacromolecules and their functioning in living systems [2, 26]. Cooling and low temperature exposure significantly change the structure of water, the fractions of which are involved into stabilization of biopolymers conformation. An essential thermodynamic feature of water fraction associated with the surface of biopolymer is its lower melting temperature as compared to free water and its following decrease during protein degradation [35, 36]. It is believed that water fractions localized near surface or in closed cavities of biopolymers have diffused zone of crystallization during freezing, and it is within the temperature range of 0... -70°C and even to -80°C [7, 63]. The molecular mobility in tightly fixed bi- or monomolecular layer of water is preserved even at lower temperatures (-120 or -130°C).

There are published data about the existence of water molecules bound with internal surface of protein globule [54, 87]. Moreover, the correlation period of orientational relaxation of this water was found to be consistent with that of rotational relaxation of proteins [11, 95]. This supports the fact that water tightly bound with protein molecule is located in deep cavities of protein globule.

As it was mentioned above, the properties of water maintaining the native conformation of biomacromolecules in physiological conditions are exposed to significant changes during cooling and, especially, freezing [2, 26, 120]. Therefore, the revealing of how water participates in stability/instability in the structure of biopolymers cooled down to 0°C or frozen down to near-zero negative temperatures is important to understand the mechanisms of cryodamages, their reversibility during cryopreservation cycle and to develop the means and approaches of cryoprotection. The balance of forces maintaining native conformation of protein globule in water is acquired due to localization of certain number of hydrophobic groups both inside and on the surface of protein globule [51, 56, 60, 94], presence of water molecules inside the macromolecules [54, 87]. The balance of forces is provided by a dual character of water effect on protein structure: stabilizing (due to hydrophobic interrelations) and loosening (due to the effects of competition between water molecules for interchain hydrogen bonds within the protein globule) [1]. Water features in the vicinity



действий) и разрыхляющему (за счет эффектов конкуренции молекул воды за межцепочечные водородные связи в пределах белковой глобулы) [56]. Свойства воды около гидрофобных или гидрофильных участков биологических молекул радикально отличаются от таковых в растворе. Существует предположение, что холодовая денатурация обусловлена изменениями нативных взаимодействий между молекулами воды и неполярными группами [66]. Показано, что гидратационный слой, структурно связанный с белковой молекулой, имеет большое значение для стабилизации ее нативной конформации, необходимой для реализации белком специфических функций [1]. Связанную, упорядоченную или биологическую воду в криобиологии еще называют незамерзающей (правильнее говорить о незамерзшей воде, допуская неравновесные состояния) [14, 117, 118].

Следствием влияния низких температур на биомолекулы является нарушение водородных связей – фактора, стабилизирующего нативную структуру биополимеров и определяющего их пространственную конформацию. Вместе с тем вклад водородных связей в стабилизацию нативной пространственной структуры биополимера невелик, поскольку выигрыш в свободной энергии при переносе групп, образующих водородную связь, из растворителя (воды) в интерьер макромолекулы мал. Аналогичные выводы о стабилизирующем характере водородных связей были получены при теоретическом рассмотрении переходов спираль-клубок в полиаминокислотах [41]. Однако система водородных связей в белке может качественно отличаться от таковой в синтетических полипептидах, поэтому некоторые авторы осторожно подходят к выводам, сделанным на основе модельных систем [15].

Кроме водородных связей, важное место при обсуждении вопроса о стабильности белков отводится гидрофобным эффектам. Отчасти это обусловлено ролью структуры растворителя в определении стабильности белковой молекулы, но в большей степени простым экспериментальным обнаружением гидрофобных эффектов. Значительное число гидрофобных боковых цепей, скрытых во внутренней части молекулы нативного белка, вступают в контакт с растворителем в результате разупорядочивания структуры. Любое возмущение, снижающее их стабильность, например воздействие низких температур, будет изменять растворимость белка в том случае, если оно не приводит к возникновению нового и энергетически более выгодного способа размещения неполярных групп [101].

Большую роль в обеспечении сохранности белков играют скорости замораживания. При охлажде-

hydrophobic and hydrophilic regions of biological molecules drastically differ from those in a solution. There is a suggestion that cold denaturation is stipulated by the changes in native interactions between water molecules and non-polar groups [19]. It was shown that hydration layer being structurally bound with protein molecule had a significant value for stabilization of its native conformation required to implement the specific protein functions [2]. Cryobiology defines also the bound, ordered or biological water as non-frozen one (one should speak about non-frozen water taking into account the non-equilibrium states) [116, 117, 120].

Effect of low temperatures on biomacromolecules results in the disorder of hydrogen bonds, being the factor stabilizing native structure of biopolymers and determining their spatial conformation. Herewith, the contribution of hydrogen bonds into stabilization of native spatial structure of biopolymer is insignificant since the advantage of free energy during transition of groups forming hydrogen bond from solvent (water) into interior of macromolecule is non-essential. Similar conclusions on stabilizing character of hydrogen bonds were obtained during theoretical analysis of the helix-to-coil transitions in polyamino acids [90]. However, the system of hydrogen bonds in protein can fundamentally differ from that in synthetic polypeptides, therefore some authors are careful when making conclusions based on the used model systems [61].

When discussing the question of protein stability the attention is paid not only to hydrogen bonds but to hydrophobic effects as well. This is partially due to the role of the solvent structure in providing the stability of protein molecule, but mostly owing to a simple experimental discovery of hydrophobic effects. A great number of hydrophobic side chains, hidden in the inner part of native protein molecule comes into contact with solvent as a result of structure disordering. Any disturbance, reducing their stability, *e. g.* the cold temperature exposure will change the protein solubility in case if it would not lead to a new, energetically more efficient location way for nonpolar groups [95].

Freezing rates are prominent in providing protein integrity. During cooling with moderate rates (~20 deg/min) there are formed the crystals with larger surface as compared with those occurring when freezing with low rates (~1–2 deg/min) [12]. There are reports about significant denaturation changes in biological macromolecules when using moderate cooling rates [99]. High freezing rates significantly reduce the period of molecules stay under unfavourable conditions, so their use is preferable [119]. There is a believe that with increasing the protein concentration its stability enhances. This fact can be explained by a decreased relative amount of protein on the 'ice – concentrated solution' interface [108]. Melting processes of biological macromolecules in concentrated



нии с умеренными скоростями (~20 град/мин) образуются кристаллы с большей поверхностью по сравнению с кристаллами, которые возникают при замораживании с низкими скоростями (~1–2 град/мин) [60]. Описаны случаи, когда при использовании умеренных скоростей охлаждения получали значительные денатурационные изменения биомолекул [104]. Высокие скорости замораживания существенно снижают время пребывания молекул в неблагоприятных условиях, поэтому их использование более предпочтительно [120]. Считают, что с увеличением концентрации белка его стабильность повышается, это можно объяснить уменьшением относительного количества белка на поверхности раздела лед – концентрированный раствор [112]. В концентрированных растворах белков даже процессы плавления биомолекул обратимы в 85–90% случаев [4]. Однако по окончательной картине структурно-функциональных нарушений биомолекул невозможно определить относительный вклад отдельных факторов криоповреждения [3, 14, 97].

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию естественных белковых смесей. Замораживание сыворотки кордовой крови, фолликулярной жидкости, водно-солевых экстрактов плаценты со скоростями охлаждения от 1 до 7 град/мин приводит к разрыхлению поверхностных полипептидных цепей и агрегации биомолекул [31, 35, 42, 82]. Показано, что при образовании агрегатов с молекулярными массами 120 и 300 кДа высокомолекулярными белками (альбумин, глобулины) в агрегации могут принимать участие и биомолекулы с молекулярной массой 12 кДа и ниже [33]. Наблюдали структурные изменения в белковых компонентах сыворотки плацентарной крови человека, связанные с диамид-индуцируемой агрегацией белков, обусловленной, очевидно, процессами замораживания-отогрева, поскольку различий, связанных с длительностью и температурами хранения (–20 и –196°C), в формировании агрегатов не обнаружено [67]. Возникающее при криоконсервировании нарушение межмолекулярных взаимодействий в сложных, многокомпонентных системах, в том числе сыворотки крови, может приводить не только к структурно-конформационным изменениям белковых молекул, но и некоторых показателей всей белковой системы. Так, исследование влияния факторов криоконсервирования на стабильность физиологических показателей в образцах сыворотки крови, хранившейся в течение 2 и 25 лет при –25°C по сравнению с образцами, хранившимися в течение месяца, выявило в них определенные изменения. Уровень одних показателей (натрия, кальция, железа и креатинина) не изменялся, в то время как другие имели значимые раз-

protein solutions are even reversible in 85–90% of cases [9]. However, the final pattern of structural and functional disorders of biological macromolecules could not be used to determine a relative contribution of individual factors of cryodamage [6, 70, 120].

Currently a great attention is paid to studies concerning natural protein mixtures. Freezing of cord blood serum, follicular fluid, aqueous-saline placenta extracts with cooling rates from 1 to 7 deg/min led to loosening of surface polypeptide chains and aggregation of biological macromolecules [41, 82, 84, 92]. It was shown that formation of aggregates with 120 and 300 kDa molecular weights by high molecular weight proteins (albumin, globulins) could also involve biological macromolecules with molecular weight of 12 kDa and below [80]. The structural changes found in protein components of human placental blood serum were associated with diamide-induced protein aggregation, that obviously was stipulated by freeze-thawing processes, since no differences associated with the duration and storage temperatures (–20 and –196°C) in aggregate formation were observed [25]. The disorders in molecular interactions in the complex, multi-component systems, including blood serum, occurring during cryopreservation, might lead not only to structural and conformational changes in protein molecules, but affect some indices of the entire protein system. In particular, the investigation of the effect of cryopreservation factors on stability of physiological indices in blood serum samples stored for 2 and 25 years at –25°C, if compared with those stored for 1 month, revealed certain changes. The level of some indices (sodium, calcium, iron and creatinine) remained unchanged, while the other ones had significant differences (uric acid concentration and bilirubin level in the samples decreased by 7.6 and 59.4%, respectively). Probably, these disorders could be related primarily to the possible changes in the interactions between various components of serum, including macromolecules and small organic and inorganic molecules [38]. Storage of blood serum at cryobank under –25°C resulted in the changed albumin and free fatty acids concentration. In the samples stored for 6–12 years we noted a significant increase in these indices compared with those stored within 3 years. The authors believed that an increased level of free fatty acids resulted from their release out of lipoprotein triglyceride-containing complexes, but the elevation of albumin content, estimated colorimetrically using bromocresol green dye in serum samples might be due to a progressing protein unfolding, allowing tighter binding of reactive groups of protein macromolecules with the dye [48]. Proceeding from the analyzed results of experimental data the mechanism of conformational and structural cryoinjuries in biological macromolecules was established [83], the recommendations were made for cryoprotectant-free



личия (концентрация мочевой кислоты снижалась на 7,6%, уровень билирубина в пробах – на 59,4%). Можно предположить, что данные нарушения могут быть связаны, в первую очередь, с возможностью изменений во взаимодействии между различными компонентами сыворотки, включая макромолекулы, малые органические и неорганические молекулы [80]. При хранении в криобанке сыворотки крови при -25°C были выявлены изменения концентрации альбумина и свободных жирных кислот. В образцах, хранившихся в течение 6–12 лет, отмечалось значимое увеличение данных показателей по сравнению с 3-летними образцами. Повышение уровня свободных жирных кислот является, по мнению авторов, следствием их высвобождения из липопротеидных триглицеридсодержащих комплексов, а увеличение содержания альбумина, оцененное колориметрически с использованием красителя бромкрезол зеленый, в образцах сыворотки может быть обусловлено прогрессирующим анфолдингом белка, допускающим большее связывание реакционных групп белковых макромолекул с красителем [86]. На основе результатов анализа экспериментальных данных был установлен механизм конформационно-структурных криоповреждений биомacroмолекул [30], выработаны рекомендации по криоконсервированию белковых растворов без криопротекторов с использованием режима охлаждения со скоростью не менее 100 град/мин с целью сохранения нативных свойств биомacroмолекул [34].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что при действии как охлаждения до субнулевых температур, так и замораживания-отогрева белки претерпевают конформационные изменения, которые могут сопровождаться потерей активности и структурными нарушениями. Считают, что ферменты, имеющие четвертичную структуру, могут инактивироваться при понижении температуры уже до 0°C . Инактивацию связывают с диссоциацией олигомеров на субъединицы, вызванной ослаблением гидрофобных взаимодействий. Указанные изменения обусловлены совокупностью физико-химических факторов (повышенная концентрация электролитов и метаболитов, изменение условий межмолекулярных взаимодействий, дегидратационные эффекты, изменение структуры растворителя, pH и т. д.), которые возникают при понижении температуры и фазовом переходе воды в водно-белковой системе в твердое состояние. Однако четкого представления о механизмах криолабильности биомacroмолекул до настоящего времени не существует. Остается открытым вопрос о раздельном влиянии низких температур и растворителя на структуру белков и, как следст-

cryopreservation of protein solutions using cooling regimen with the rate not lower than 100 deg/min, in order to preserve native properties of biological macromolecules [81].

Thus, the analysis of published data suggests that the effect of both cooling down to subzero temperatures and freeze-thawing is expressed in conformational changes in proteins, which may be accompanied by a loss of activity and structural disorders. There is a believe that the enzymes with a quaternary structure may be inactivated already during decrease of the temperature down to 0°C . The inactivation is associated with dissociation of oligomer into subunits, caused by weakening of hydrophobic interactions. These changes are stipulated by a complex of physical and chemical factors (increased concentration of electrolytes and metabolites, changed conditions of molecular interactions, dehydration effects, change in solvent structure, pH, *etc.*), that occur under temperature decrease and phase transition of water in aqueous-protein system into a solid state. However, there is no distinct notion on mechanisms of cryolability in biological macromolecules. The question about a discrete influence of low temperatures and a solvent on protein structure and, consequently, their activity is still open. Of note is the fact, that the studies do not demonstrate (with rare exceptions) the limits of reversibility of revealed changes in structural and functional properties of proteins after freeze-thawing. There is a small number of reports with noted resistance of some proteins in solution during freeze-thawing, while a specific reason for such a stability has not been revealed yet. Since the data confirming the relationship between molecular organization of catalytic proteins and cryolability or cryoresistance are not sufficient, further experimental studies are necessary.

References

1. Aksyonov S.I. Water as a regulator in biological systems. *Studia Biophys* 1981; 258(1): 37–38.
2. Askochenskaya N.A., Aksyonov S.I. Water structure and its role in biological systems // *Uspekhi Sovr Biologii* 1972; 73(2): 288–306.
3. Araki N. Freezing injury in mitochondrial membranes. 1. Susceptible components in the oxidation systems of frozen and thawed rabbit liver mitochondria. *Cryobiology* 1977; 14(2): 144–150.
4. Araki N. Inactivation of mitochondrial-oxoglutarate dehydrogenase complex as a result of phospholipid dehydration induced by freeze-thawing. *Cryobiology* 1977; 14(2): 151–159.
5. Beinert H., Hansen R.E., Hartrell C.H. Kinetic studies on cytochrome-C-oxidase by combined EPR and reflectance spectroscopy after rapid freezing. *Biochim Biophys Acta* 1976; 423(2): 339–356.
6. Belous, A.M., Bondarenko, V.A. Structural changes in biological membranes during cooling. Kiev: Naukova Dumka; 1982.



вие, на их активность. Следует отметить, что в исследованиях (за редким исключением) не показана степень обратимости обнаруженных изменений структурно-функциональных свойств белков после замораживания-отогрева. Имеется небольшое количество работ, в которых отмечена устойчивость некоторых белков в растворе при замораживании-отогреве, причем конкретная причина подобной стабильности не определена. Поскольку данных, подтверждающих взаимосвязь между молекулярной организацией каталитических белков и криолабильностью или криорезистентностью недостаточно, необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований.

Литература

1. Аскоченская Н.А., Аксенов С.И. Структура воды и ее роль в биологических системах // *Успехи совр. биологии*. – 1972. – Т. 73, №2. – С. 288–306.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. думка, 1982. – 255 с.
3. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432 с.
4. Брандс Дж. Конформационные переходы белков в воде и смешанных растворителях // *Структура и стабильность биологических макромолекул*. – М., 1973. – С. 174–254.
5. Бурштейн Э.А. Изучение быстрой подвижности белковых структур методом собственной флуоресценции // *Равновесная термодинамика нативной структуры белка: Сб. ст.* – Пушино, 1977. – С. 60–83.
6. Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белка как метод изучения быстрой структурной динамики // *Молекуляр. биология*. – 1983. – Т. 17, Вып. 3. – С. 455–467.
7. Волькенштейн М.В. Биофизика. – М.: Наука, 1981. – 256 с.
8. Габуда С.П., Гайдаш А.А., Дребушак В.А. и др. Уточнение данных ЯМР о структуре связанной воды в коллагене с помощью сканирующей калориметрии // *Журнал структур. химии*. – 2005. – Т. 46, №6. – С. 1174–1176.
9. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 145 с.
10. Грищенко В.И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя нации // *Проблемы криобиологии*. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 269–274.
11. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // *Проблемы криобиологии*. – 2002. – №1. – С. 54–84.
12. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П. и др. Использование фолликулярной жидкости человека на этапе культивирования гамет и эмбрионов в программе ЭКО // *Проблемы репродукции*. – 1999. – №6. – С. 43–46.
13. Дузу П. Криобиохимия. – М.: Мир, 1980. – 282 с.
14. Жмакин А.И. Физические основы криобиологии // *Успехи физических наук*. – 2008. – Т. 178, №3. – С. 243–266.
15. Ламри Р., Билтонен Р. Термодинамические и кинетические аспекты конформации белков в связи с физиологическими функциями // *Структура и стабильность биологических макромолекул*. – М., 1973. – С. 7–173.
16. Леонов Б.Н., Нардид О.А., Моисеев В.А. Влияние состава растворителя на структуру сывороточного альбумина в растворе // *V Всесоюз. конф. по спектроскопии биополи-*
7. Belous A. M., Grischenko V.I. *Cryobiology*. Kiev: Naukova Dumka; 1994.
8. Berliner L., editor. *Spin labeling. Theory and applications*. New York: Academic Press; 1976.
9. Brandts J.F. Protein conformational changes in water and mixed solutes. In: Timasheff S.N., Fasman G., editors. *Structure and Stability of Biological Macromolecules*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1969, p. 213.
10. Burstein, E. A. The study of rapid dynamics of protein structures using the intrinsic fluorescence method. In: Burstein E.A., editor. *Equilibrium dynamics of native protein structure*. Pushchino: Center of Biological Research, RAS; 1977, p. 60–83.
11. Burstein, E. A. The intrinsic luminescence of protein as the method for studies of rapid structural dynamics. *Molecular Biologiya* 1983; 17(3): 455–467.
12. Cao E., Chen Y., Cui Z., Forster P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioenerg* 2003; 82(6): 684–690.
13. Chilson O.F., Costello L.A., Kaplan N.O. Effect of freezing on enzymes. *Fed Proc* 1965; 24(2): 55–65.
14. Chirgadze, Yu. N., Ovsepyan A. M. Role of water in peptide structures mobility. Investigation of conformational changes during hydration. *Biofizika* 1972; 17(4): 569–574.
15. Chollot R., Anderson L.L. Conformational changes associated with the reversible cold inactivation of riboso-1,5-diphosphate-carboxylase-oxygenase. *Biophys Biochem Acta* 1977; 482(1): 228–240.
16. Cleland K.A.P. Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric β -galactosidase. *Arch Biochem Biophys* 2000; 384(2): 398–406.
17. Darbyshire B. The influence of dehydration on catalase stability: A comparison with freezing effects. *Cryobiology* 1974; 11(2): 148–151.
18. Darbyshire B. The results of freezing and dehydration of horseradish peroxidase. *Cryobiology* 1975; 12(3): 276–281.
19. Dias C.L., Ala-Nissila T., Wong-Ekkabut J. et al. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation. *Cryobiology* 2010; 60(1): 91–99.
20. Duzu P. *Cryobiochemistry*. Moscow: Mir; 1980.
21. Eckhardt B.M., Oeswein J.Q., Bewley T.A. Effect of freezing on aggregation of human growth hormone. *Pharm Res* 1991; 8(11): 1360–1364.
22. Echale H., Anderegg J. W. An X-ray scattering investigation of the urea denaturation of BSA. *J Am Chem Soc* 1960; 82(10): 5085–5092.
23. Eytan G.D., Carroll R.C., Schats G. et al. Arrangement of the subunits in solubilised and membrane-bound cytochrome oxidase from bovine heart. *J Biol Chem* 1975; 260(22): 8589–8603.
24. Falko O.V., Prokopyk O.S., Volina V.V. et al. Application of placental blood serum to correct disordered morphofunctional state of adrenal glands at experimental atherosclerosis. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 2013; 23(1): 75–83.
25. Falko O.V., Zemlianskykh N.G., Lipina O.V. et al. Modification of placental blood serum proteins induced by low temperatures. *Biochemistry. Supplement Series Biomedical Chemistry* 2012; 6(2): 194–202.
26. Franks F. *Water and aqueous solutions at subzero temperatures*. NY: Plenum Press; 1982: 484.
27. Frolova S.A. Low temperature influence on plant protease inhibitor system [dissertation]. Petrozavodsk, 2008.
28. Fedorov B.A. On the determination of globular protein volume in solution by small-angle X-ray scattering. *Biopolymers* 1981; 20(3): 621–624.
29. Fink A.L. Cryoenzymology: The use of sub-zero temperatures and fluid solutions in study of enzyme mechanism. *J Theor Biol* 1976; 61(3): 419–445.
30. Fink A.L., Cartwright S.L. *Cryoenzymology*. CRC Gut Rev in Biochem 1981; 11(2): 145–207.



- меров, 2–4 окт. 1984 г.: тезисы докл. – Харьков, 1984. – С. 142–143.
17. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
 18. Луговой В.И. Первичные механизмы криповреждения ферментов // Актуальные проблемы криобиологии: – К., 1981. – С. 15–41.
 19. Луговой В.И. Первичные механизмы криповреждения ферментов // Вторая всесоюз. конф. по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии, 9–11 окт. 1984 г.: тезисы докл. – Харьков, 1984. – С. 32.
 20. Луговой В.И., Золочевская Л.И., Дзюба А.Н. Активность некоторых цитоплазматических ферментов в экзоцеллюлярной среде костного мозга при низкотемпературной консервации // Проблемы гематологии. – 1975. – Т. 21, №9. – С. 10–12.
 21. Луговой В.И., Моисеев В.А. Влияние низких температур на растворимые ферменты // Итоги науки и техн. ВИНТИ АН СССР. Сер. Биофизика". – 1979. – Т. 9. – С. 53–79.
 22. Маркосян К.А., Погосян Г.Г., Пойтян Н.А. и др. Взаимодействие неорганических анионов с атомами меди цитохромоксидазы // Биохимия. – 1979. – Т. 44, №5. – С. 844–848.
 23. Метод спиновых меток / Под ред. Л. Берлинера. – М.: Мир, 1979. – 640 с.
 24. Моисеев В.А., Манк В.В., Зинченко В.Д. и др. Гидратационные и дегидратационные свойства гемоглобина // Механизмы криповреждения и криозащиты биологических структур. – К., 1977. – С. 44–47.
 25. Моисеев В.А., Морозова Т.Ф., Микулинский Ю.Е. Влияние гиперконцентраций солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 7. – С. 51–52.
 26. Морозова Т.Ф., Грек А.М., Коптелов В.А. и др. Изменения спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина в концентрированных растворах хлористого натрия // Криобиология и криомедицина. – 1982. – Вып. 10. – С. 22–27.
 27. Морозова Т.Ф., Моисеев В.А. Влияние солей на стабильность иммуноглобулина лошади // Криобиология и криомедицина. – 1982. – Вып. 10. – С. 27–29.
 28. Мосолов В.В., Соколова Е.В. Взаимодействие гликолей и глицерина с активным центром трипсина и химотрипсина // Докл. АН СССР. – 1972. – Т. 207, №1. – С. 91–93.
 29. Мошко Ю.А. Криоконсервирование сыворотки кордовой крови, определение ее биологической активности и клинической эффективности в терапии хронических сальпингоофоритов: Дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 2003. – 161 с.
 30. Нардід О.А. Внутрішньо- і міжмолекулярні взаємодії та їх роль у крипошкодженні й кризахисті біологічних структур: Автореф. дис. ... док. біол. наук. – Харків, 2012. – 42 с.
 31. Нардід О.А., Горобченко О.А., Ніколов О.Т. та ін. Дослідження впливу низьких температур на сироватку кордової крові методом діелектрометрії надзвичайно високих частот // Фізіологічний журнал. – 2005. – Т. 51, №5. – С. 56–60.
 32. Нардид Э.О. Биологическая активность криоконсервированной сыворотки кордовой крови в экспериментальной модели постгистерэктомиического синдрома: Дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 2010. – 133 с.
 33. Нардид Э.О., Науменко Е.И., Розанова Е.Д. и др. Влияние режимов замораживания на агрегацию белков сыворотки кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №3. – С. 311–315.
 34. Нардид Э.О., Розанова Е.Д., Цымбал Л.В. и др. Состояние белков сыворотки кордовой крови после замораживания // Биофизика. – 2009. – Т. 54, Вып. 5. – С. 881–886.
 35. Нардид Э.О., Цымбал Л.В., Нардид О.А. Влияние режимов замораживания на динамику водно-белковой системы сыворотки кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 544–545.
 31. Fishbein W.N., Griffin J.L. External-internal ice and functional-structural damage in mouse liver mitochondria as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1975; 12(6): 369–673.
 32. Fishbein W.N., Griffin J.L. Parameters of freezing damage to mouse liver. *Cryobiology* 1976; 13(5): P. 542–556.
 33. Fishbein W.N., Stouell R.E. Studies of the mechanism of freezing damage to mouse liver using a mitochondria enzyme assay. II. Comparison of slow and rapid cooling rates. *Cryobiology* 1969; 6(3): 227–234.
 34. Fitzgerald S.P., Campbell J., Lamont J.V. et al. Stabilization of enzymes during freezing. US Patent 6,579,707. 2003.
 35. Fung B.M., Wei Sh.C. The effect of alkali and alkaline earth salt on the structure and hydrated collagen fibers as studies by elaterium NMR. *Biopolymers* 1973; 1(5): 1053–1065.
 36. Fung B.M., Witschel J., McAmis L.L. The state of water on hydrated collagen as studies by pulsed NMR. *Biopolymers* 1974; 13(9): 1767–1776.
 37. Gabuda S.P., Gaidash A.A., Drebushak V.A. et al. Refinement of NMR data of the structure of combined water in collagen with use of scanning calorimetry. *J Struct Chem* 2005; 46(6): 1174–1176.
 38. Gislefoss R.E., Grimsrud T.K., Morkrid L. Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68(5): 402–409.
 39. Gomes G., Pikal M.J., Rodrigues-Hornedo N. Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solution. *J Pharm Sci* 2001; 18(1): 90–97.
 40. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation for cell suspensions. Kiev: Naukova dumka; 1994.
 41. Gorobchenko O.A., Gerodes A.G., Nardid O.A. et al. Dielectric properties of human ovary follicular fluid at 9.2 GHz. *Bioelectrochemistry* 2010; 79(2): 193–197.
 42. Grash L., Noak F. NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solution. *Biophys Biochem Act* 1976; 453(1): 218–232.
 43. Grischenko V.I. Achievements in cryobiology and cryomedicine for national health. *Problems of Cryobiology* 2008; 18(3): 269–274.
 44. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application. *Problems of Cryobiology* 2002; (1): 54–84.
 45. Grischenko V.I., Gerodes A.G., Petrushko M.P. et al. Application of human follicular fluid at the culturing stage of gametes and embryo in IVF program. *Russian Journal of Human Reproduction* 1999; (6): 43–46.
 46. Gulevsky A.K., Relina L.I. Molecular and genetic aspects of protein cold denaturation. *CryoLetters* 2013; 34(1): 62–82.
 47. Hey M.J., Cdongh J.M. Ion effects on macromolecules in aqueous solution. *Nature* 1976; 262(5571): 807–809.
 48. Hostmark A.T., Glatte E., Jellum E. Effect of long-term storage on the concentration of albumin and free fatty acids in human sera. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61(6): 443–447.
 49. Ilder D.R., Freeman H.C. Stability to freezing of steroidbinding proteins in fish plasma. *Comp Biochem and Physiol Biochem* 1973; 44(1): 179–183.
 50. Ishivata Sh. Freezing of action: Reversible oxidation of a sulfhydryl group and structure change. *J Biochem* 1976; 80(3): 595–609.
 51. Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 1979; 277(5696): 491–492.
 52. Juul P. Stability of plasma enzymes during storage. *Clin Chem* 1982; 257(10): 57–51.
 53. Kahn P.C., Schanvede J.N., Ippalito A.M. et al. Volume changes of globular protein association. *Biophys J* 1980; 32(1): 86–87.
 54. Kauzmann W., Moore K., Schulz D. Protein densities from X-ray crystallographic coordinates. *Nature* 1974; 248(5447): 447–449.



36. Насонов Е.Л., Виноградов В.А. Опиоидные пептиды как регуляторы системы иммунитета // Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра АМН России. – 1990. – Т. 10, №1. – С. 3–10.
37. Науменко Е.И., Розанова Е.Д. Изучение механизмов криоповреждения изолированной цитохромоксидазы // Вторая Всесоюз. конф. по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии, 9–11 окт. 1984 г.: тезисы докл. – Харьков, 1984. – С. 61.
38. Недев К.Н., Хургин Ю.И. Исследование поверхностного слоя белковой глобулы: гидратация молекулы α -химо-трипсина // Молекуляр. биология. – 1977. – Т. 9, №4. – С. 761–767.
39. Никольченко А.Ю. Исследование влияния низких температур на структурно-функциональные свойства белков α_2 -глобулиновой фракции и трансаминаз донорской крови человека: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1999. – 169 с.
40. Обозная Э.И., Маркова О.П. Исследование конечного звена цитохромоксидазной цепи – цитохромоксидазы в клетках костного мозга после глубокого охлаждения // Криобиология и криомедицина. – 1975. – Вып. 1. – С. 60–62.
41. Пасынский А.Г., Эльпинер И.Э. О зависимости гидратации белков от pH и температуры среды // Доклады АН СССР. – 1955. – Т. 105, №6. – С. 1296–1299.
42. Погожих Д.Н., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 22–26
43. Поляк Р. Исследование пространственной структуры иммуноглобулинов // Иммуноглобулины: – М., 1981. – С. 9–15.
44. Пфайль В.П., Привалов П.Н. Конформационные изменения в белках // Биохимическая термодинамика. – М., 1982. – С. 95–137.
45. Розанова Е.Д., Моисеев В.А., Науменко Е.И. Влияние замораживания-отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы // Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т. 57, №1. – С. 61–64.
46. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. – М.: Изд-во МГУ, 1987. – 188 с.
47. Троицкий Г.В., Тэтин С.Ю., Ефетов К.А. Исследование конформации иммуноглобулинов при частичной дегидратации. Данные температурно-пертурбационной спектрофотометрии // Доклады АН УССР. – 1984, №2. – С. 84–95.
48. Фалько О.В., Прокопюк О.С., Волина В.В., Ліпіна О.В. Застосування сироватки плацентарної крові як спосіб корекції порушень морфофункціонального стану наднирників при експериментальному атеросклерозі // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Том 23, №1. – С. 75–83.
49. Франкс Ф. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C. – К.: Наук. думка, 1985. – 386 с.
50. Фролова С.А. Влияние низкой температуры на активность протеиназно-ингибиторной системы растений: Дис. ... канд. биол. наук. – Петрозаводск, 2008. – 132 с.
51. Хенох М.А., Першина В.П. Образование гибридных ферментов под влиянием глубокого охлаждения // Криобиология и криомедицина: – Харьков, 1980. – С. 98–101.
52. Хенох М.А., Першина В.П., Лапинская Е.М. Влияние глубокого замораживания на белковые растворы // Цитология. – 1966. – Т. 8, №6. – С. 769–772.
53. Хургин Ю.И., Шерман Ф.Б., Тусупкалиев У.П. Изотермы гидратации глобулярных белков в динамическом режиме // Биохимия. – 1977. – Т. 42, №3. – С. 490–497.
54. Чиргадзе Ю.Н., Овсян А.М. Роль воды в подвижности пептидных структур. Изучение конформационных переходов при гидратации // Биофизика. – 1972. – Т. 17, №4. – С. 569–574.
55. Шайо Б. Исследование методом ЭПР изменений, возникающих в каталазе при замораживании и сублимации // Холод. техника. – 1976. – №1. – С. 44–45.
55. Kawato S., Jochida S., Orii Y. Nanosecond time-resolved fluorescence investigations of temperature-induced conformational change in cytochrome oxidase in phosphatidylcholine vesicles and solubilized systems. *Biochem Biophys Acta* 1981; 634(1): 85–92.
56. Keshavarz E., Nakai S. The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins. *Biochem Biophys Acta* 1979; 576(2): 269–279.
57. Khenokh M.A., Persina V.P. Formation of hybrid enzymes under the action of profound cooling. *Kriobiologia i kriomeditsina* 1980; (7): 98–101.
58. Khenokh M.A., Persina V.P., Latinskaya Ye.M. Influence of deep freezing on protein solutions. *Tsitologiya* 1966; 8(6): 769–772.
59. Khurgin Iu.I., Sherman F.B., Tusupkaliev U. Isotherms of globular protein hydration under dynamic conditions. *Biokhimiia* 1977; 42(3): 490–498.
60. Klotz I.M. Comparison of molecular structure of proteins: Helix content, distribution of apolar residues. *Arch Biochim Biophys* 1970; 138(4): 704–706.
61. Lumry R., Biltonen R. Thermodynamic and kinetic aspects of protein conformations in relation to physiological function. In: Timasheff S., Fasman G., editors. *Structure and stability of biological macromolecules*. Moscow; 1973.
62. Leonov B.N., Nardid O.A., Moiseyev V.A. The influence of solvent composition on the serum albumin structure in solution. *Proceedings of the 5th All-USSR Conference on Spectroscopy of Biopolymers*; Oct 2–4; Kharkov, 1984. p. 142–143.
63. Lichtenstein G. I. The method of spin labels in molecular biology. Moscow: Nauka; 1974.
64. Lugovoy V.I. Primary mechanisms of enzyme cryodamage. In: *Actual problems in cryobiology*. Kyev; 1981. p. 15–41.
65. Lugovoy V.I. Primary mechanisms of enzyme cryodamage. *Proceeding of the 2nd All-Union Conference on Theoretical and Applied Problems of Cryobiology*; 1984 Oct 9–11; Kharkiv; 1984. p. 32.
66. Lugovoy V.I., Zolocheskaia L.I., Dziuba A.N. Activity of certain cytoplasmic enzymes in the exocellular medium of the bone marrow preserved at low temperature. *Problemy Gematologii i Perelivaniia Krovi* 1975; 21(9): 10–12.
67. Lugovoy V.I., Moiseyev V.A. Low temperature influence on soluble enzymes. *Itogi Nauki i Tekhn VINITI AS SU. Ser Biofizika* 1979; 9: 53–79.
68. Market C.L. Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits. *Science* 1963; 140(3573): 341–350.
69. Markosyan K.A., Pogosyan G.G., Paityan N.A. et al. Interaction of inorganic anions with copper atoms of cytochrome oxidase. *Biokhimiya* 1979; 44(5): 844–848.
70. Milson T.J., Keller R.H. The variable effects of cryopreservation on peripheral blood mononuclear populations. *J Clin Labor Immunology* 1982; 7(1): 205–213.
71. Moiseev V.A., Mank V.V., Zinchenko V.D. Hydration and dehydration properties of hemoglobin. In: *Mechanisms of Cryodamage and Cryoprotection of Biological Structures*. Kyev: 1977. p. 44–47.
72. Moiseev V.A., Morozova T.F., Mikulinsky Yu.E. Influence of salt hyper concentration on horse immunoglobulin conformational state. *Kriobiologia i Kriomeditsina* 1980; (7): 51–52.
73. Morozova T.F., Grek A.M., Koptelov V.A. et al. Changes in spectral properties of bovine serum albumin in concentrated solutions of sodium chloride. *Kriobiologia i Kriomeditsina* 1982; (10): 22–27.
74. Morozova T.F., Moiseyev V.A. Salt influence on horse immunoglobulin stability. *Kriobiologia i Kriomeditsina* 1982; (10): 27–29.
75. Mosolov V.V., Sokolova E.V. Interaction of glycols and glycerin with the active center of trypsin and chymotrypsin. *Doklady Academy of Sciences of USSR* 1972; 207(1): 91–93.
76. Moshko Yu.A. Cryopreservation of cord blood serum, evaluation of its biological activity and clinical efficiency in therapy of chronic salpingoophorites [dissertation]. Kharkov; 2003.



56. Aksyonov S.I. Water as a regulator in biological systems // *Studia Biophys.* – 1981. – Vol. 258, №1. – P. 37–38.
57. Araki N. Freezing injury in mitochondrial membranes. 1. Susceptible components in the oxidation systems of frozen and thawed rabbit liver mitochondria // *Cryobiology.* – 1977. – Vol. 14, №2. – P. 144–150.
58. Araki N. Inactivation of mitochondrial-oxoglutarate dehydrogenase complex as a result of phospholipid dehydration induced by freeze-thawing // *Cryobiology.* – 1977. – Vol. 14, №2. – P. 151–159.
59. Beinert H., Hansen R.E., Hartrell C.H. Kinetic studies on cytochrome-C-oxidase by combined EPR and reflectance spectroscopy after rapid freezing // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. – Vol. 423, №2. – P. 339–356.
60. Cao E., Chen Y., Cui Z., Forster P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // *Biotechnol. Bioenerg.* – 2003. – Vol. 82, №6. – P. 684–690.
61. Chilson O.F., Costello L.A., Kaplan N.O. Effect of freezing on enzymes // *Fed. Proc.* – 1965. – Vol. 24, №2. – P. 55–65.
62. Chollot R., Anderson L.L. Conformational changes associated with the reversible cold inactivation of riboso-1,5-dyphosphate-carboxylase-oxygenase // *Biophys. Biochem. Acta.* – 1977. – Vol. 482, №1. – P. 228–240.
63. Cleland K.A.P. Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric β -galactosidase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 384, №2. – P. 398–406.
64. Darbyshire B. The influence of dehydration on catalase stability: A comparison with freezing effects // *Cryobiology.* – 1974. – Vol. 11, №2. – P. 148–151.
65. Darbyshire B. The results of freezing and dehydration of horseradish peroxidase // *Cryobiology.* – 1975. – Vol. 12, №3. – P. 276–281.
66. Dias C.L., Ala-Nissila T., Wong-Ekkabut J. et al. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation // *Cryobiology.* – 2010. – Vol. 60, №1. – P. 91–99.
67. Falko O.V., Zemlianskykh N.G., Lipina O.V. et al. Modification of placental blood serum proteins induced by low temperatures // *Biochemistry. Supplement Series Biomedical Chemistry.* – 2012. – Vol. 6, №2. – P. 194–202.
68. Echole E. H., Anderegg J. W. An X-ray scattering investigation of the urea denaturation of BSA // *J. Am. Chem. Soc.* – 1960. – Vol. 82, №10. – P. 5085–5092.
69. Eckhardt B.M., Oeswein J.Q., Bewley T.A. Effect of freezing on aggregation of human growth hormone // *Pharm. Res.* – 1991. – Vol. 8, №11. – P. 1360–1364.
70. Eytan G.D., Carroll R.C., Schats G. et al. Arrangement of the subunits in solubilised and membrane-bound cytochrome oxidase from bovine heart // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 260, №22. – P. 8589–8603.
71. Fedorov B.A. On the determination of globular protein volume in solution by small-angle X-ray scattering // *Biopolymers.* – 1981. – Vol. 20, №3. – P. 621–624.
72. Fink A.L. Cryoenzymology: The use of sub-zero temperatures and fluid solutions in study of enzyme mechanisms // *J. Theor. Biol.* – 1976. – Vol. 61, №3. – P. 419–445.
73. Fink A.L., Cartwright S.L. Cryoenzymology // *CRC Gut. Rev. in Biochem.* – 1981. – Vol. 11, №2. – P. 145–207.
74. Fishbein W.N., Griffin J.L. External-internal ice and functional-structural damage in mouse liver mitochondria as a function of cooling rate // *Cryobiology.* – 1975. – Vol. 12, №6. – P. 369–673.
75. Fishbein W.N., Griffin J.L. Parameters of freezing damage to mouse liver // *Cryobiology.* – 1976. – Vol. 13, №5. – P. 542–556.
76. Fishbein W.N., Stouell R.E. Studies of the mechanism of freezing damage to mouse liver using a mitochondria enzyme assay. II. Comparison of slow and rapid cooling rates // *Cryobiology.* – 1969. – Vol. 6. – P. 227–234.
77. Fitzgerald S.P., Campbell J., Lamont J.V. et al. Stabilization of enzymes during freezing. US Patent 6,579,707. – 2003.
77. Nardid O.A., Dyubko T.S., Repina S.V. A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins. *Cryobiology* 1997; 34: 107–113.
78. Nardid O.A., Pogozhykh D.N., Repina S.V. et al. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta. *J Exp Integr Med* 2012; 2(3): 213–217.
79. Nardid E.O. Biological activity of cord blood serum in experimental model of posthysterectomy syndrome [dissertation]. Kharkov; 2010.
80. Nardid E.O., Naumenko E.I., Rozanova E.D. et al. Effect of freezing regimens on protein aggregation of human cord blood serum. *Problems of Cryobiology* 2006; 16(3): 311–315.
81. Nardid E.O., Rozanova E.D., Tsymbal L.V. et al. Effect of freezing on cord blood serum proteins. *Biophysics* 2009; 54(5): 881–886.
82. Nardid E.O., Tsymbal L.V., Nardid O.A. Influence of cryopreservation regimens on dynamics of water-protein system of human cord blood serum. *Problems of Cryobiology* 2005; 15(3): 544–545.
83. Nardid O.A. Intra- and intermolecular forces and their role in cryodamage and cryoprotection of biological structures. [dissertation]. Kharkov; 2012.
84. Nardid O.A., Gorobchenko O.A., Nikolov O.T. et al. Examination of low temperature influence on cord blood serum by microwave dielectric method. *Fiziologichnyi Zhurnal* 2005; 51(5): 56–60.
85. Nasonov E.L., Vinogradov V.A. Opioid peptides as regulators of the immune system. *Biull Vsesoiuznogo Kardiolog Nauchn Tsentra AMN SSSR* 1987; 10(1): 3–10.
86. Naumenko E.I., Rozanova E.D. Studying of isolated cytochrome oxidase cryodamage mechanisms. Second All-USSR conference on theoretical and applied problems of cryobiology; 1984 Oct. 9–11; Kharkiv, Ukraine.
87. Nedev K.N., Khurgin Yu. I. A study of the surface layer of a protein globule. Hydration of α -chymotrypsin molecule. *Mol. Biol.* 1975; 9: 761–767.
88. Nikolchenko A.Ju. Investigation of the influence of low temperature on the α 2-globulin group proteins and transaminases of the human donor blood [dissertation]. Kharkov; 1999.
89. Oboznaya E. I., Markova O.P. Investigation of terminal link of cytochrome oxidase chain of cytochrome oxidase in bone marrow cells after deep cooling. *Kriobiologia i Kriomeditsina* 1975; (1): 60–62.
90. Pasynskiy A.G., Elpiner I.E. About dependence of protein hydration on pH and environmental temperature. *Doklady Academy of Sciences of USSR* 1955; 105(6): 1296–1299.
91. Pawelek P.D., Cheahl J., Coulombel R. et al. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiometrically conserved active site. *EMBO J* 2000; 19: 4204–4215.
92. Pogozhikh D.N., Rozanova E.D., Nardid O.A. Change of properties of human placenta aqueous-saline extracts during low temperature storage. *Problems of Cryobiology* 2008; 18(1): 22–26.
93. Polyak R. Study of immunoglobulin spatial structure. In: *Immunoglobulins*: Moscow; 1981. p. 9–15.
94. Ponnuswamy P.K., Prabhakaran M., Manavalan P. Hydrophobic packing and special arrangement of amino acid residues in globular proteins. *Biochim Biophys Acta* 1980; 623(2): 301–306.
95. Permakov E.A., Bursten E.A. Relaxation processes in frozen aqueous solution of proteins, temperature dependence of fluorescence parameters. *Studia Biophys* 1975; 51(2): 91–103.
96. Pfeil W.P., Privalov, P.L. Conformational changes in proteins. In: *Biochemical Thermodynamics*: Moscow; 1982; p. 5–139.
97. Rozanova, E.D., Moiseyev, V.A., Naumenko, E.I. The effect of freeze-thawing on the structure and function of cytochrome oxidase. *Ukr Biokhim Zhurn* 1979; 57(1): 61–64.
98. Ruegg M., Moor V., Blance B. Hydration and thermal denaturation of γ -actoglobulin: a calorimetric study. *Biochem Biophys Acta* 1975; 400(2): 334–342.



78. Fung B.M., Wei Sh. C. The effect of alkali and alkaline earth salt on the structure and hydrated collagen fibers as studied by elaterium NMR // *Biopolymers*. – 1973. – Vol. 12, №5. – P. 1053–1065.
79. Fung B.M., Witschel J., McAmis L.L. The state of water on hydrated collagen as studied by pulsed NMR // *Biopolymers*. – 1974. – Vol. 13, №9. – P. 1767–1776.
80. Gislefoss R.E., Grimsrud T.K., Morkrid L. Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 68, №5. – P. 402–409.
81. Gomes G., Pikal M.J., Rodrigues-Hornedo N. Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions // *J. Pharm. Sci.* – 2001. – Vol. 18, №1. – P. 90–97.
82. Gorobchenko O.A., Gerodes A.G., Nardid O.A. et al. Dielectric properties of human ovary follicular fluid at 9.2 GHz // *Bioelectrochemistry*. – 2010. – Vol. 79, №2. – P. 193–197.
83. Grash L., Noak F. NMR relaxation investigation of water mobility in aqueous bovine serum albumin solution // *Biophys. Biochem. Acta.* – 1976. – Vol. 453, №1. – P. 218–232.
84. Gulevsky A.K., Relina L.I. Molecular and genetic aspects of protein cold denaturation // *CryoLetters*. – 2013. – Vol. 34, №1. – P. 62–82.
85. Hey M.J., Cdongh J.M. Ion effects on macromolecules in aqueous solution // *Nature*. – 1976. – Vol. 262, №5571. – P. 807–809.
86. Hostmark A.T., Glatte E., Jellum E. Effect of long-term storage on the concentration of albumin and free fatty acids in human sera // *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* – 2001. – Vol. 61, №6. – P. 443–447.
87. Ilder D.R., Freeman H.C. Stability to freezing of steroid-binding proteins in fish plasma // *Comp. Biochem. Physiol. Biochem.* – 1973. – Vol. 44, №1. – P. 179–183.
88. Ishivata Sh. Freezing of action: Reversible oxidation of a sulfhydryl group and structure change // *J. Biochem.* – 1976. – Vol. 80, №3. – P. 595–609.
89. Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins // *Nature*. – 1979. – Vol. 277, №5696. – P. 491–492.
90. Juul P. Stability of plasma enzymes during storage // *Clin. Chem.* – 1982. – Vol. 257, №10. – P. 57–51.
91. Kahn P.C., Schanvede J.N., Ippalito A.M. et al. Volume changes of globular protein association // *Biophys. J.* – 1980. – Vol. 32, №1. – P. 86–87.
92. Kauzmann W., Moore K., Schulz D. Protein densities from X-ray crystallographic coordinates // *Nature*. – 1974. – Vol. 248, №5447. – P. 447–449.
93. Kawato S., Jochida S., Orii Y. Nanosecond time-resolved fluorescence investigations of temperature-induced conformational change in cytochrome oxidase in phosphatidylcholine vesicles and solubilized systems // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 634, №1. – P. 85–92.
94. Keshavarz E., Nakai S. The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – Vol. 576, №2. – P. 269–279.
95. Klotz I.M. Comparison of molecular structure of proteins: Helix content, distribution of apolar residues // *Arch. Biochim. Biophys.* – 1970. – Vol. 138, №4. – P. 704–706.
96. Market C.L. Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits // *Science*. – 1963. – Vol. 140, №3573. – P. 341–350.
97. Milson T.J., Keller R.H. The variable effects of cryopreservation on peripheral blood mononuclear populations // *J. Clin. Labor. Immunology*. – 1982. – Vol. 7, №1. – P. 205–213.
98. Nardid O.A., Dyubko T.S., Repina S.V. A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins // *Cryobiology*. – 1997. – Vol. 34. – P. 107–113.
99. Nardid O.A., Pogozykh D.N., Repina S.V. et al. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta // *J. Exp. Integr. Med.* – 2012. – Vol. 2, №3. – P. 213–217.
100. Pawelek P.D., Cheahl J., Coulombel R. et al. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an
99. Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J. et al. Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. *J Pharm Sci* 1999; 88(12): 1354–1361.
100. Scrutton M.C., Utter M.P. Pyruvate carboxylase. *J Biol Chem* 1965; 240(1): 1–9.
101. Sharon A., Levitt J. The effect of cryoprotective agents on intermolecular S–S formation during freezing on thiogel. *Cryobiology* 1967; 4(2): 85–89.
102. Shayo B. ESR assay of changes in catalase arising during freezing and sublimation. *Kholodovaya Tekhnika* 1976; (1): 44–45.
103. Sherman J.K. Correlation in ultrastructural cryoinjury of mitochondria with aspects of their respiratory function. *Exp Cell Res* 1971; 66: 378–384.
104. Smanson M., Parker L. Effect of crosslinking cytochrome-c-oxidase. *Arch Biochem and Biophys* 1980; 204(1): 30–40.
105. Storey K. B. Biochemical adaptation for cold hardiness. *Phil Trans R Soc* 1990; 326(1237): 635–654.
106. Sun S.P., Chang T.S., del Rosario N.O. Bovine serum albumin in lithium chloride solutions. Change in conformation. *Int J Peptide Protein Res* 1974; 6(1): 87–94.
107. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L. et al. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(2): 117–125.
108. Tang X.C., Pikal M.J., Rodrigues-Hornedo N. The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharm Res* 2005; 22(7): 1167–1175.
109. Tabors G. Protein alteration at low temperatures. In: *Proteins at low temperatures*. Washington; 1979. p. 1–27.
110. Troitsky G.V., Tetin S.Y., Efetov K.A. A study of IgG conformation under partial dehydration. Data of temperature-perturbation differential spectrophotometry. *Dopovidi Akad Sci Ukr SSR* 1984; (2): 84–95.
111. Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. Physical Mechanisms of functioning of biological membranes. Moscow; 1987.
112. Vets N., Akashi H. Nuclear magnetic resonance investigation of the state of water in protein solution. *J Biochem* 1975; 78(1): 229–234.
113. Volkenstein M.V. Biophysics. Moscow: Nauka; 1981.
114. Whittman J.H., Rosano H.L. Effects of the freeze-thaw process on amylase. *Cryobiology* 1973; 10(3): 240–243.
115. Wino W.W., Unicode V. Sulfhydryl groups of cytochrome oxidase. *J Bioenerg* 1973; 4(6): 579–590.
116. Wolfe J., Bryant G., Koster K.L. What is "unfreezable water", how unfreezable is it and how much is there? *CryoLetters* 2002; 23(3): 157–166.
117. Yoong Y., Pope J., Wolfe J. Freezing stresses and hydration of isolated cell waters. *Cryobiology* 2003; 46(3): 271–276.
118. Yu N.T., Jo B.H. Comparison of protein structure in crystals and in solution by laser Raman scattering. II. Ribonuclease and carboxypeptidase. *J Am Chem Soc* 1973; 95(15): 5033–5037.
119. Yu Z., Gacia A.S., Jonston K.P. et al. Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructured micro-particles. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58(3): 522–537.
120. Zhmakin A.I. Physical aspects of cryobiology. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk* 2008; 178(3): 243–266.



- enantiometrically conserved active site // *EMBO J.* – 2000. – Vol.19. – P. 4204–4215.
101. Permakov E.A., Bursten E.A. Relaxation processes in frozen aqueous solution of proteins, temperature dependence of fluorescence parameters // *Studia Biophys.* – 1975. – Vol. 51, №2. – P. 91–103.
 102. Ponnuswamy P.K., Prabhakaran M., Manavalan P. Hydrophobic packing and special arrangement of amino acid residues in globular proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol. 623, №2. – P. 301–306.
 103. Ruegg M., Moor V., Blance B. Hydration and thermal denaturation of γ -lactoglobulin: a calorimetric study // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1975. – Vol. 400, №2. – P. 334–342.
 104. Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J. et al. Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying // *J. Pharm. Sci.* – 1999. – Vol. 88, №12. – P. 1354–1361.
 105. Scrutton M.C., Utter M.P. Pyruvate carboxylase // *J. Biol. Chem.* – 1965. – Vol. 240, №1. – P.1–9.
 106. Sharon A., Levitt J. The effect of cryoprotective agents on intermolecular S–S formation during freezing on thiogel // *Cryobiology.* – 1967. – Vol. 4, №2. – P. 85–89.
 107. Sherman J.K. Correlation in ultrastructural cryoinjury of mitochondria with aspects of their respiratory function // *Exp. Cell. Res.* – 1971. – Vol. 66. – P. 378–384.
 108. Smanson M., Parker L. Effect of crosslinking cytochrome c oxidase // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1980. – Vol. 204, №1. – P. 30–40.
 109. Storey K. B. Biochemical adaptation for cold hardiness // *Phil. Trans. R. Soc.* – 1990. – Vol. 326, №1237. – P. 635–654.
 110. Sun S.P., Chang T.S., del Rosario N.O. Bovine serum albumin in lithium chloride solutions. Change in conformation // *Int. J. Peptide Protein. Res.* – 1974. – Vol. 6, №1. – P. 87–94.
 111. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L. et al. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // *Acta Pharmacol Sin.* – 2003. – Vol. 24, №2. – P. 117–125.
 112. Tang X.C., Pikal M.J., Rodrigues-Hornedo N. The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying // *Pharm. Res.* – 2005. – Vol. 22, №7. – P.1167–1175.
 113. Tabors G. Protein alteration at low temperatures // *Proteins at low temperatures.* – Washington, 1979. – P. 1–27.
 114. Vets N., Akashi H. Nuclear magnetic resonance investigation of the state of water in protein solution // *J. Brioche.* – 1975. – Vol. 78, №1. – P. 229–234.
 115. Whittman J.H., Rosano H.L. Effects of the freeze-thaw process on amylase // *Cryobiology.* – 1973. – Vol. 10, №3. – P. 240–243.
 116. Wino W.W., Unicode V. Sulfhydryl groups of cytochrome oxidase // *J. Bioenerg.* – 1973. – Vol. 4, №6. – P. 579–590.
 117. Wolfe J., Bryant G., Koster K.L. What is "unfreezable water", how unfreezable is it and how much is there? // *CryoLetters.* – 2002. – Vol. 23, № 3. – P. 157–166.
 118. Yoog Y., Pope J., Wolfe J. Freezing stresses and hydration of isolated cell waters // *Cryobiology.* – 2003. – Vol. 46, №3. – P. 271–276.
 119. Yu N.T., Jo B.H. Comparison of protein structure in crystals and in solution by laser Raman scattering. II. Ribonuclease and caboxypeptidase // *J. Am. Chem. Soc.* – 1973. – Vol. 95, №15. – P. 5033–5037.
 120. Yu Z., Gacia A.S., Jonston K.P. et al. Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructured micro-particles // *Eur. J. Pharm. Biopharm* – 2004.– Vol. 58, №3. – P. 522–537.