

TADEUSZ WOJTASZEK

NISKIE TEMPERATURY W BIOLOGII *

Pojęcie ciepła i zimna wprowadzone przez filozofów jońskich było już przedmiotem zainteresowania myślicieli starożytnych. Arystoteles sformułował znaną powszechnie tezę o właściwościach zimna i ciepła, które łącznie z «suchością» i «wilgocią» określały cztery elementy: ogień, wodę, powietrze i ziemię.

Nic więc dziwnego, że w późniejszym rozwoju nauk przyrodniczych, a zwłaszcza w okresie rewolucyjnego kształtowania się empiryzmu w nauce, nie pominięto zjawisk związanych z ciepłem i zimnem. Za ewolucją tych pojęć, która doprowadziła do dzisiejszego stanu wiedzy o temperaturze, a która to ewolucja zachodziła w wyniku szybkiego rozwoju fizyki, podążały także eksperymenty biologów, mające za zadanie poznanie wpływu różnych temperatur na organizmy żywe, by następnie wykorzystać dokonane obserwacje w dalszym rozwoju nauk biologicznych tak dla celów metodycznych, jak i czysto praktycznych.

W drugiej połowie XVIII w. Spallanzani przez 40 lat badał wpływ niskich temperatur na zjawiska życiowe u owadów, ryb, ptaków, ssaków i człowieka. W roku 1787 wykazał on, że jajeczka i gąsienice niektórych motyli wytrzymują temperaturę do -17° i że spermatozoidy znoszą oziębienie do -15° , mimo iż zwierzęta, od których pochodziły, ginęły już przy temperaturze -7° .

W połowie XIX w. dzięki dalszym odkryciom w dziedzinie fizyki i chemii następuje duży skok w dziedzinie badań z zakresu niskich temperatur w biologii. Na przykład w dziedzinie fizyki na okres ten przypadają odkrycia i wynalazki tej miary jak skroplenie powietrza, tlenu i azotu, opracowanie sposobów kontroli i dokładnego pomiaru temperatury itp.

Wykorzystując te zdobycze biologowie w swoich badaniach eksperymentalnych poznają coraz lepiej wpływ niskich temperatur na organizmy, komórki i tkanki roślin i zwierząt. Brown i Escombe (1897) stwierdzają, że przy powolnym zamrażaniu aż do temperatury -192° i przy przechowywaniu w tej temperaturze w ciągu 11 godzin nasiona nie traciły zdolności kiełkowania. Kilka lat później Mafadyen i Rowland wykazali, że bakterie utrzymują swoją żywotność, a enzymy aktywność przy temperaturze ciekłego powietrza (-194°), podczas gdy temperatury wysokie powodowały całkowite zabijanie bakterii oraz zupełną inaktywację enzymów.

* Skróc referatu wygłoszonego na zebraniu Oddziału P. T. P. im. Kopernika w Krakowie w dniu 5. V. 1959.

Tego rodzaju odkrycia stały się bodźcem do intensywnych badań nad wpływem niskich temperatur na żywe organizmy z rozmaitego punktu widzenia. Szeroki zakres tego rodzaju badań zapoczątkowany pod koniec ubiegłego stulecia trwa do dziś. W rezultacie tych obszernych i z punktu widzenia teoretycznego bardzo ciekawych badań biologowie wykorzystują obecnie niskie temperatury w rozmaitych dziedzinach swojej działalności. Do najważniejszych dziedzin zastosowania niskich temperatur w biologii należą:

- a) konserwowanie materiału biologicznego przez zamrażanie i przechowywanie w stanie zamrożonym,
- b) konserwowanie materiału biologicznego drogą suszenia w stanie zamrożenia, co umożliwia przechowywanie go po wysuszeniu w temperaturze normalnego otoczenia.

A oto niektóre przesłanki, na których opiera się stosowanie niskich temperatur w biologii.

Przez dłuższy czas uważano, że w temperaturach nieco poniżej zera biochemiczne i biofizyczne procesy w żywych komórkach zostają przerwane lub w wysokim stopniu zahamowane. Ostatnio jednak uzyskano wiele danych sprzeciwiających się takiemu punktowi widzenia. Wykazano np., że wiele gatunków bakterii i grzybów niższych przeżywało, a nawet rozmnażało się w ciągu jednego roku przy temperaturze -8° , -9° , chociaż środowisko, w którym się znajdowały, było zamrożone. Okazało się, że jedną z głównych przyczyn tego zjawiska jest utrzymywanie się aktywności enzymów. Joslyn (1949) stwierdził, że w takich warunkach może jednak powstać naruszenie równowagi w cyklu wiązanych reakcji biochemicznych w żywych komórkach, na skutek czego wytworzyć się mogą toksyczne produkty metabolizmu, które powodują śmierć komórki. Wynika więc z tego, że jeśli temperatura nie zostanie obniżona do tego stopnia, aby zahamować aktywność wszystkich enzymów, to okres utrzymania przy życiu komórek skraca się na skutek autointoksykacji. Siser i Josephson wykazali np., że lipaza jest jeszcze aktywna przy $-24,5^{\circ}$, a inwertaza hydrolizuje sacharozę jeszcze przy -18° . Na podstawie całego szeregu badań wykazano, że w większości wypadków temperatura -25° hamuje już procesy w wystarczający sposób, aby przechowywać je w okresie kilku tygodni. Wyniki tych badań znalazły zastosowanie i w praktyce, np. przy przechowywaniu produktów żywnościowych w stanie zamrożenia.

W zmianach, jakie mogą zachodzić w materiale zamrożonym, oprócz enzymów poważną rolę odgrywa jeszcze zjawisko dyfuzji. Poznaniu tego zjawiska w materiale zamrożonym przypisuje się obecnie duże znaczenie w wyjaśnieniu przyczyn obumierania komórek znajdujących się w stanie zamrożenia. Dowiedziono, że zamrożenie materiału, jeśli nie osiągnie się odpowiednio niskiej temperatury, nie wstrzymuje procesu dyfuzji. Tą drogą mogą więc przenikać z komórki do komórki niektóre produkty przemiany materii, na miejsce których może wnikać woda. W wyniku tych zaburzeń może się zmienić dynamiczna równowaga komórek i otoczenia, co w konsekwencji może spowodować śmierć komórki.

Przedstawionymi wyżej zjawiskami możemy częściowo tłumaczyć, dlaczego niektóre bakterie, jajeczka i plemniki ssaków giną prędko przy przechowywaniu ich w temperaturze tuż poniżej zera, podczas gdy w temperaturach niskich mogą być przechowywane przez czas dłuższy, kilku, a nawet kilkunastu miesięcy bez utraty żywotności.

Ważną rolę w procesach zachodzących w materiale zamrożonym i przechowywanym w stanie zamrożenia odgrywa woda. Znane jest w fizykochemii zjawisko wymrażania z roztworów zarówno elektrolitów, jak i nieelektrolitów, jeśli nie zostanie przekroczona temperatura punktu eutektycznego. Na przykład temperatura eutektyczna, czyli temperatura zamrażania całego roztworu, a nie tylko części wody, dla 23% roztworu soli kuchennej wynosi około -22° . Wiadomo, że niezwiązana woda komórkowa występuje w postaci mniej lub więcej skoncentrowanych roztworów. Jeśli więc temperatura zamrażania i przechowywania leży poniżej punktu eutektycznego, to nastąpi zjawisko wydzielania się kryształków lodu, na zewnątrz których następuje zagęszczanie się roztworu. Roztwór ten staje się coraz bardziej hipertoniczny, co w końcowym efekcie wywołuje denaturację białek. Szkodliwego działania tej zwiększającej się koncentracji soli można uniknąć przy przechowywaniu materiału w temperaturze poniżej -40° . Jest to bowiem temperatura niższa od temperatury punktu eutektycznego roztworów występujących w większości żywych komórek.

Przez dłuższy czas utrzymywała się wśród wielu biologów teoria, że śmierć komórki w wyniku zamrażania następuje na skutek mechanicznego uszkodzenia błon plazmatycznych przez kryształki lodu, które tworzą się na zewnątrz komórki. Jednakże ostatnio coraz więcej zwolenników znajduje teoria, że śmierć komórki w czasie zamrażania następuje na skutek zamrażania wewnątrzkomórkowego, ściślej zaś na skutek wewnątrzkomórkowej krystalizacji. Badania nad wpływem wewnątrzkomórkowej krystalizacji podczas zamrażania trwają do dziś. Tak np. Smith i Smiles (1953) wykazali, że przed wewnątrzkomórkową krystalizacją chroni komórki 15-procentowy roztwór gliceryny. Badacze ci wykazali, że w plemnikach zamrażanych w obecności tego roztworu krystalizacja wewnątrzkomórkowa nie zachodziła. Po odtajaniu komórki te nie wykazywały żadnych zmian morfologicznych i utrzymywały normalną ruchliwość biczyków. Komórki kontrolne, czyli zamrażane bez gliceryny, wykazywały wewnątrzkomórkową krystalizację i ginęły już w temperaturze $5-20^{\circ}$ poniżej zera.

Już dawno było wiadome, że roztwór cukru może do pewnego stopnia chronić żywe komórki od szkodliwego działania niskich temperatur. U roślin poddawanych działaniu temperatur poniżej zera stwierdzano rozkład skrobi na cukry proste, co obniżało temperaturę zamrażania soku komórkowego. Z drugiej jednak strony znane są rośliny, które posiadają dużo cukru w soku komórkowym, jak np. trzcina i buraki cukrowe, a mimo to są bardzo wrażliwe na chłody. To, że cukier nie zawsze może zabezpieczyć komórki przed przemarzeniem zostało potwierdzone badaniami nad zamrażaniem rozmaitych komórek i tkanek w roztworach cukru o różnym stężeniu. Tak np. przy zastosowaniu 50%-wego roztworu sacharozy około 20%

spermatozoidów żaby znosiło zamrażanie w temperaturze ciekłego powietrza. Jednakże ogromna większość komórek i tkanek nie wytrzymała zamrażania w roztworach cukru. Zaczęto więc poszukiwać innych roztworów, które mogłyby zabezpieczać komórki przed szkodliwym działaniem zamrażania. Taką substancją okazała się gliceryna (1949). Wykazano, że alkohol ten swe ochronne działanie na komórki zawdzięcza swym właściwościom fizycznym i chemicznym. Najważniejszymi spośród tych właściwości są: zupełna nietoksyczność, znaczne obniżanie temperatury zamarzania roztworów wodnych; przy zamarzaniu, które zachodzi w temperaturze 70—110° poniżej zera daje strukturę bezkrystaliczną — szklistą; można ją nazwać buforem temperatury.

Wyniki badań uzyskane w ostatnich latach przy zastosowaniu zamrażania w obecności gliceryny pozwoliły rozszerzyć zastosowanie konserwacji materiału biologicznego metodą zamrażania i przechowywania w stanie zamrożonym. Szczególnego znaczenia nabrała ta metoda w nauce i praktyce medycznej. Tak np. erythrocyty, których do niedawna nie udało się utrzymać *in vitro* w temperaturze 5—10° dłużej niż trzy tygodnie, dziś w obecności 15—30%-wego roztworu gliceryny w temperaturze —79° można je przechowywać przez długie miesiące. Inną ważną dziedziną w medycynie, w której metoda ta znalazła szerokie zastosowanie, to transplantacja tkanek, skóry, a ostatnio nawet całych organów. Kliniczne zastosowanie transplantacji było dotąd utrudnione otrzymaniem odpowiedniego materiału w tym momencie, kiedy był on potrzebny. Badania wykazujące, że zabezpieczone gliceryną i przechowywane w temperaturze —79 lub —190° tkanki zdolne są do regeneracji po przeszczepieniu, umożliwiły tworzenie zapasów rozmaitych transplantantów, które w przyszłości mogą być wykorzystane dla celów chirurgicznych.

Duże znaczenie posiada obecnie ta metoda w hodowli zwierząt. Na szeroką skalę stosowana jest do konserwacji spermy zwierząt hodowlanych. W obecności gliceryny w temperaturze —79° spermata może być przechowywana bez utraty swej aktywności w ciągu roku, a nawet i dłużej.

W ostatnich kilkunastu latach dużego znaczenia nabrała inna metoda konserwowania materiału biologicznego przy zastosowaniu niskich temperatur, a mianowicie metoda mrozeniowo-próżniowa, zwana także liofilizacją.

Aczkolwiek próby suszenia materiału biologicznego w stanie zamrożenia czynione były dość dawno, bo jeszcze w XIX w., to jednak szerszy zasięg zastosowania tej metody w eksperymentach laboratoryjnych przypada na okres międzywojenny. W latach ostatniej wojny metoda ta znalazła już szerokie zastosowanie w skali przemysłowo-technicznej. Bezpośrednią przyczyną wprowadzenia liofilizacji na szeroką skalę, zwłaszcza w Stanach Zjednoczonych i Anglii, było zwiększone zapotrzebowanie na plazmę i surowicę krwi, powstałe na skutek działań wojennych. Wykonywane w latach przedwojennych badania laboratoryjne wykazały, że najlepszą metodą konserwacji zarówno plazmy, jak i surowicy, jest metoda mrozeniowo-próżniowa. Kiedy więc zaistniała potrzeba produkowania większych ilości tych środków leczniczych — metoda mogła być od razu zastosowana.

Podstawową zasadą metody mroźniowo-próżniowej (liofilizacji) jest to, że cząsteczki wody usuwane są z materiału suszonego z pominięciem fazy ciekłej, czyli na drodze sublimacji. Istnieje tu więc układ lód-para, podczas gdy przy suszeniu materiału nie zamrożonego w temperaturach powyżej zera mamy układ ciecz-para, a przy suszeniu w temperaturach powyżej zera materiału uprzednio zamrożonego powstaje układ lód-ciecz-para. W układzie faz, jaki istnieje w metodzie mroźniowo-próżniowej, suszenie np. substancji białkowych odznacza się tym, że podczas suszenia znika siatka lodu powstała w czasie zamrażania, a białko i sole utrzymują się w molekularnym szkielecie, tworząc gąbczastą masę. Wysuszone w ten sposób masa może się łatwo uwodnić do stanu podobnego do pierwotnego, czyli tego, jaki istniał przed suszeniem. Mówimy, że masa ta jest liofilna, stąd nazwa liofilizacja.

Technika suszenia metodą mroźniowo-próżniową polega na zamrożeniu materiału (możliwie w najkrótszym czasie), a następnie odciągania z materiału pary wodnej. Uzyskuje się to za pomocą umieszczenia zamrożonego materiału w obszarze próżni i wychwytywania cząsteczek pary bądź to na drodze mechanicznego odciągania, bądź też wymrażania na silnie oziębionej powierzchni. W zależności od rodzaju suszonego materiału temperatura suszenia wynosi kilkanaście do kilkudziesięciu stopni C poniżej zera. Oziębianie powierzchni kondensującej cząsteczki wody uzyskuje się za pomocą takich substancji chłodzących jak skroplone powietrze lub azot, suchy lód (zestalony CO_2), mieszanki suchego lodu z rozpuszczalnikami organicznymi (np. alkohol metylowy lub etylowy lub aceton), bądź też za pomocą odpowiednich kompresorów chłodniczych.

A oto najważniejsze dziedziny zastosowania metody mroźniowo-próżniowej w biologii:

1) Histologia i histochemia. Pierwsze próby zastosowania metody liofilizacji w eksperymentach biologicznych wykonane były w badaniach histologicznych. W 1890 r. Altmann podał sposób utrwalania preparatów histologicznych za pomocą tego sposobu. Aczkolwiek przewidywał on wielkie znaczenie tej metody dla dalszego rozwoju cytologii i histologii, to jednak — jak to zresztą najczęściej bywa — nie zdołał on poznać wielu zjawisk, które miały duże znaczenie dla skutecznego stosowania metody. Wiele z tych zjawisk i problemów zostało wyjaśnionych dopiero w ostatnich latach, a inne czekają jeszcze na rozwiązanie. Uzyskanie najważniejszego celu w tej dziedzinie, a było nim uzyskanie preparatów utrwalonych w stanie jak najmniej morfologicznie zmienionym, nie było rzeczą łatwą. Trzeba było przeprowadzić wiele eksperymentów, aby móc wykazać to, co dzisiaj uważa się za podstawę stosowania liofilizacji w histologii, a mianowicie, że największy wpływ na uzyskiwanie dobrych preparatów posiada sposób zamrażania. Szybkie zamrażanie w bardzo niskich temperaturach, małe rozmiary zamrażanych obiektów to podstawowe zasady stosowanej obecnie liofilizacji na tym odcinku.

Duże usługi oddaje także obecnie liofilizacja badaniom w dziedzinie histochemii. Identyfikacja zarówno nieorganicznych, jak i organicznych składników komórki została dzięki tej metodzie poważnie ułatwiona.

2) Konserwowanie bakterii i wirusów. Już we wczesnym okresie rozwoju mikrobiologii było wiadome, że dużo mikroorganizmów znosi wysuszenie. Stwierdzono, że w suchym pyłe niektóre bakterie, między innymi chorobotwórcze, utrzymują swoją wirulentność przez długie tygodnie, a nawet miesiące. Poczyniono więc próby wykorzystania tej właściwości drobnoustrojów do przechowywania ich kultur w stanie wysuszonym. Cóż się jednak okazało? Przy zastosowaniu metod suszenia w temperaturach powyżej zera znaczna część bakterii ginęła. Dopiero zastosowanie liofilizacji pozwoliło na skuteczne konserwowanie niemal wszystkich kultur drobnoustrojów. Obecnie znamy wiele modyfikacji tej metody. Różnią się one techniką zamrażania i suszenia oraz stosowaniem rozmaitych substancji ochronnych. Spośród tych ostatnich stosowane są buliony, surowice, zawiesiny martwych bakterii i inne. Wykonane eksperymenty wykazały, że przy stosowaniu liofilizacji do konserwacji kultur bakterii nie można mówić o jakichś standardowych warunkach tej metody. Różną wrażliwością na czynniki działające przy użyciu tej metody odznaczają się nie tylko poszczególne gatunki, ale nawet szczepy. Jednak mimo tego w dziedzinie tej liofilizacja odgrywa bardzo ważną rolę.

Równoległe ze stosowaniem liofilizacji do konserwacji kultur bakterii rozwija się także jej zastosowanie do konserwacji wirusów. Po wykazaniu, że niezbędnym warunkiem utrzymania żywotności wirusów w procesie liofilizacji jest obecność białka, metoda ta jest obecnie podstawową metodą ich konserwacji.

3) Konserwowanie plazmy i składników krwi. Mało jest chyba dzisiaj ludzi, którzy by nie słyszeli o pobieraniu przez specjalne ośrodki krwi ludzkiej, która jest ogromnie ważnym środkiem ratowania życia ludzkiego. Nie wszyscy jednak wiedzą o losach pobranej od krwiodawców krwi. Jedną z podstawowych substancji uzyskiwanych z pobranej krwi jest tzw. plazma. Jest to produkt posiadający wszystkie właściwości krwi, poza tymi, które związane są z obecnością białych i czerwonych ciałek krwi. Te ostatnie bowiem odłączane są na drodze specjalnej obróbki. Wszystkie labilne składniki plazmy z ich fizjologicznymi i leczniczymi właściwościami bardzo szybko ulegają zniszczeniu, jeśli plazma utrzymywana jest w stanie ciekłym. Poza tym w plazmie pozostającej w takim stanie bardzo łatwo rozwijać się mogą mikroorganizmy, które spowodować mogą całkowitą jej nieużyteczność dla celów leczniczych. I znowu najlepszą metodą konserwacji tego cennego środka jest liofilizacja. Pozwala ona zabezpieczyć plazmę na długi okres czasu, bo dochodzący do 5, a nawet 10 lat, dzięki czemu można ją zastosować wtedy, gdy zachodzi potrzeba.

Z takimi samymi rezultatami można tą metodą zabezpieczać inne składniki krwi, a wśród nich tak powszechnie znaną surowicę.

4) Konserwowanie antybiotyków. Odkrycie penicyliny przez Fleminga, a następnie wprowadzenie jej jako powszechnego środka leczniczego w latach ostatniej wojny, dało nowe pole zastosowania liofilizacji. I chociaż dzisiaj metodę liofilizacji na tym odcinku można już do pewnego stopnia traktować historycznie wobec nowych metod produkcji penicyliny krystalicznej, to jednak pamiętać trzeba,

że penicylina i inne antybiotyki konserwowane metodą mrozeniowo-próżniową uratowały i w dalszym ciągu ratują wiele istnień ludzkich.

5) Konserwowanie tkanek. Oprócz metody konserwowania tkanek i organów polegającej na przechowywaniu ich w stanie zamrożonym, w tym samym celu stosowana jest także liofilizacja. W wielu wypadkach daje ona lepsze rezultaty na tym odcinku. Wydaje się, że wyższość tej ostatniej metody polega na tym, że eliminuje ona bardzo niebezpieczną fazę, jaką jest faza tajania przed zabiegiem transplantacji. Dla zilustrowania wartości tej metody przy konserwowaniu tkanek i organów warto przytoczyć eksperyment wykonany przez Weisa i Teilora (1949). Wycinki nerwów zamrażali szybko do temperatury -150° za pomocą ciekłego azotu, po czym suszyli je w temp. -40° w ciągu jednego tygodnia. Po wysuszeniu przechowywali je w warunkach sterylnych w ciągu 2—4 miesięcy. Przed transplantacją tkanki te moczyli w roztworze fizjologicznym w próżni w temperaturze pokojowej, dopóki nie uzyskały normalnego wyglądu. Następnie przeszczepiano je na miejsce zniszczonych nerwów tylnych kończyn szczurów. Transplantanty te przyjmowały się lepiej aniżeli transplantanty żywych nerwów. Dzisiaj możemy już mówić o udanych próbach przeszczepiania nie tylko takich tkanek, jak wycinki nerwów czy skóry, ale o przeszczepianiu naczyń krwionośnych, partii przewodu pokarmowego, a nawet większych organów.

6) Konserwowanie produktów odżywczych. Jeśli metoda konserwowania produktów odżywczych drogą przechowywania ich w stanie zamrożonym jest już dość szeroko stosowana, to metoda suszenia ich w stanie zamrożenia nie ma jeszcze praktycznego zasięgu, poza wyjątkowo cennymi środkami, które mają raczej charakter leczniczy. Wydaje się jednak, że metoda mrozeniowo-próżniowa odegra i w tej dziedzinie poważniejszą rolę.

7) Inne dziedziny zastosowania. Oprócz wymienionych wyżej dziedzin zastosowania liofilizacji istnieje jeszcze szereg innych odcinków biologii, w których metoda ta daje duże usługi. Do dziedzin tych należą: biochemia, mikroskopia elektronowa, rentgenologia, radiologia i inne.