Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины

Национальная академия наук Украины

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Национальная академия наук Украины
Институт проблем криобиологии и криомедицины

National Academy of Sciences of Ukraine
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Current problems
of cryobiology and cryomedicine

Edited by Anatoliy N. Goltsev,
Academician of the National
Academy of Sciences of Ukraine

Kharkov 2012

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины

Под редакцией
академика НАН Украины
А.Н. Гольцева

Харьков 2012

УДК 57.043+615.832.9

Освещаются результаты исследований последних лет по выяснению механизмов криоповреждений, криозащите, природной стойкости биологических объектов к холоду и их репарации после действия холода, созданию эффективных средств искусственной криозащиты биологических систем разного уровня организации и разработка на их основе технологий криоконсервирования. Исследованы механизмы действия холода на состояние организма животных и людей. Продемонстрирована возможность корректировать разбалансированное состояние гемопоэтической и иммунной систем организма реципиентов с аутоиммунными заболеваниями в разных модельных системах криоконсервированными продуктами фетоплацентарного комплекса. Изложены результаты изучения биологии стволовых клеток и создания на их основе иммунобиологических препаратов для лечения некоторых заболеваний.

Висвітлюються результати досліджень останніх років щодо з'ясування механізмів кріопошкоджень, кріозахисту, природної стійкості біологічних об'єктів до холоду і їх репарації після дії холоду, створенню ефективних засобів штучного кріозахисту біологічних систем різного рівня організації та розробка на їх основі технологій кріоконсервування. Досліджено механізми дії холоду на стан організму тварин і людини. Продемонстрована можливість коригувати розбалансований стан гемопоетичної і імунної систем організму реципієнтів з аутоімунними захворюваннями в різних модельних системах кріоконсервованими продуктами фетоплацентарного комплексу. Викладено результати вивчення біології стовбурових клітин і створення на їх основі імунобіологічних препаратів для лікування деяких захворювань.

Рецензенты: д.б.н. проф. В.Г. Книгавко
д.м.н. проф. Н.Н. Попов

Рекомендована к печати Ученым советом Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (протокол №9 от 9.07.2012)

Видання здійснено за рахунок власних коштів на випуск наукової друкованої продукції.

Редакторы: В.С. Холодный
Л.В. Рудоман

© Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 2012

ISBN 978-966-02-6504-2

Памяти Валентина
Ивановича Грищенко

Предисловие

В предлагаемой вниманию читателей монографии, созданной коллективом авторов Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, освещены актуальные проблемы влияния холода на биологические системы.

В 1972 году по инициативе и при активной поддержке Президента академии наук Б.Е. Патона в Харькове был создан Институт проблем криобиологии и криомедицины, который по структуре, научной тематике, масштабу выполняемых исследований занял ведущее место в мире среди других учреждений аналогичного профиля.

Создание первого института такого профиля в г. Харькове было обусловлено значительными научными достижениями харьковских ученых в области теоретической и прикладной физики низких температур, технической криогеники и низкотемпературного приборостроения.

Институт – единственное в Украине и на территории бывшего СССР научное учреждение, которое осуществляет комплексные фундаментальные исследования и прикладные разработки в области криобиологии и криомедицины для их применения в биотехнологиях, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой и микробиологической промышленности.

Значительный вклад в развитие основных научных направлений внесли академики НАН Украины Б.И. Веркин, Б.Г. Лазарев, И.М. Базов, В.И. Грищенко, А.Н. Гольцев; чл.-корреспонденты НАН Украины Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, А.М. Утевский, Е.А. Гордиенко; профессора Г.А. Бабийчук, В.А. Бондаренко, В.И. Луговой, В.А. Моисеев, Б.П. Сандомирский, А.А. Цуцаева, Т.Н. Юрченко, А.Ю. Петренко, А.К. Гулевский и др.

Институт создан и развивается как комплексное научное учреждение, в котором в тесном сотрудничестве с физиками, химиками, математиками и инженерами работают биологи и медики.

За 40-летний период работы в результате проведенных исследований изучены многие механизмы криоповреждений, криозащиты биологических систем различного уровня организации и их репарации после холодовых повреждений. Кроме того, были исследованы особенности холодовых разрушений и самосборки клеток на молекулярном уровне. Созданы эффективные криопротекторы и криозащитные среды для новых и усовершенствованных технологий низкотемпературного замораживания и длительного хранения биологических объектов различного происхождения. Изучены механизмы устойчивости организмов к действию экстремальных факторов и механизмы их холодовой адаптации в естественных и искусственных условиях. Исследование особенностей перестройки метаболизма и физиологических функций пойкилотермных и гибернирующих животных позволило выявить новый класс биорегуляторов, способных индуцировать состояние гибернации у человека.

В настоящее время в институте работают 344 сотрудника, среди них академик и чл.-корреспондент НАН Украины, 21 доктор наук, 134 кандидата наук.

При институте на хозрасчетных началах функционируют Специальное конструкторско-технологическое бюро с опытным производством и ГП «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МЗ Украины».

В ИПКиК создан не имеющий аналогов в Украине криобанк, который в соответствии с решением Кабинета министров имеет статус «Национальное достояние» и может быть использован для долгосрочного хранения генофонда редких и исчезающих видов животных, рыб и растений.

При институте работает Международная кафедра ЮНЕСКО, которую возглавляет директор института академик А. Н. Гольцев. Координатором этой кафедры является иностранный член НАН Украины, проф. Б. Дж. Фуллер (Великобритания). Основной целью работы кафедры является подготовка научных кадров, в том числе стажировка научных сотрудников института в ведущих лабора-

ториях Европы. На кафедре работают ведущие ученые Украины, США, Великобритании, Канады, Японии.

В ИПКиК функционирует специализированный Ученый совет по защите кандидатских и докторских диссертаций по специальностям «криобиология» и «криомедицина», по профилю Совета присвоены степень доктора наук 34 научным сотрудникам и степень кандидата наук 194 научным сотрудникам.

Сотрудниками института опубликовано более 2700 научных работ и 77 монографий, получено 345 патентов и 220 авторских свидетельств.

В институте работают лауреаты четырех Государственных премий СССР и Украины, а также именных премий НАН, НАМН и МЗ Украины.

Институт издает журнал «Проблемы криобиологии и криомедицины» на русском/украинском и английском языках.

Изложенные в книге материалы исследований по криобиологии и криомедицине предназначены для биологов, медиков и ученых других специальностей.

1. Фундаментальные аспекты криобиологии

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины

Механизмы защиты клеток от криоповреждения вне- и внутриклеточным льдом

Е.А. Гордиенко*, О.И. Гордиенко,
Л.Г. Кулешова, Л.Ф. Розанов

Отдел низкотемпературного консервирования
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: gordijenko@nas.gov.ua*

Непременным условием замораживания клеток без образования внутриклеточного льда является высокая водная проницаемость плазматических мембран, которая для разного типа клеток определяется структурными особенностями мембран. Корреляция между высокими значениями гидравлической проницаемости L_p, способностью выдерживать большие потоки воды и, следовательно, высокие скорости замораживания эволюционно обусловлена необходимостью выполнения клетками своих специфических функций. Показано, что искусственная экспрессия аквапоринов-3 в мембранах клеток дрожжей [52], ооцитов и эмбрионов мышей [27, 28, 44], повышающая их гидравлическую проницаемость, существенно улучшает способность клеток переносить замораживание. Как известно, эмбрионы рыб плохо переносят процедуры традиционных методов криоконсервирования, включающие насыщение криопротекторами и осмотическое удаление воды в течение медленного охлаждения [30], поскольку они значительно превосходят по размерам эмбрионы млекопитающих, отличаются сложной гетерогенной структурой, большим содержанием внутриклеточной воды и характеризуются очень низкой гидравлической

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 9–44.
© Е.А. Гордиенко, О.И. Гордиенко, Л.Г. Кулешова, Л.Ф. Розанов, 2012

проницаемостью. M. Hagedorn с соавт. [29, 30], исследуя особенности внутриклеточного льдообразования в аквапорин-3-модифицированных и немодифицированных эмбрионах зебрафиш (*Danio rerio*), установили, что присутствие водных каналов не изменяет характер распространения льда в эмбрионах. В обоих случаях внутриклеточный лед в них формируется при –8°C в течение нескольких секунд (до 30 с) после появления внеклеточного льда во внешнем растворе или же перивителлиновой жидкости при его контакте с эмбриональной поверхностью и является смертельным. Поскольку при отсутствии внеклеточного льда 88–98% эмбрионов зебрафиш способны выдерживать высокие концентрации раствора, авторы исключают как химическое повреждение мембраны, так и ее повреждение осмотическим потоком воды [46], и считают, что именно внеклеточный лед является триггером внутриклеточного льдообразования. Предполагается, что кристаллы льда, вступая в контакт с поверхностью эмбрионов, вызывают их физическую деформацию, в результате которой в мембране возможны формирование разрывов и фактически сквозное прорастание внеклеточного льда через эмбрионы, что наглядно проиллюстрировано криомикроскопически [30]. Авторы этой работы не исключают также, что контакт внеклеточного льда с внешней поверхностью мембраны, в соответствии с представлениями M. Toner с соавт. [53], индуктирует в ней структурные изменения, в результате которых внутренняя поверхность мембраны становится эффективным катализатором внутриклеточного льда. Внутриклеточное льдообразование в эмбрионах зебрафиш и подобных им объектах, например ооцитах морской звезды [40], как правило, происходит при достаточно высоких температурах (выше –10°C). Вопрос, почему ответ данной разновидности ооцитов и эмбрионов на замораживание отличается от ответа ооцитов мыши, остается открытым. По-видимому, важную роль в этом играют размер клеток и различная гидравлическая проницаемость их мембран. Безусловно, искусственная экспрессия аквапоринов в плазматических мембранах клеток – это перспективный путь корректировки гидравлической проницаемости при оптимизации протоколов криоконсервирования. Однако он может быть успешным далеко не для всех биологических объектов, имеющих низкую гидравлическую проницаемость.

При внутриклеточном льдообразовании сохранность клеток зависит как от суммарного внутриклеточного объема кристаллов льда, так и от их фактического размера. Данные литературы свидетельствуют, что внутриклеточные кристаллы вызывают необратимые повреждения клеток, если объемная часть льда в клетках составляет порядка 10^{-2} (в частности, для гепатоцитов крыс такой критический объем внутриклеточного льда составляет 2,0–3,7% [39]), а критический размер внутриклеточных кристаллов льда – порядка 10^{-2} мкм [51]. X. Han и J.K. Critser [31] разработали физико-математическую модель, позволяющую рассчитать размер внутриклеточных кристаллов льда и описать их взаимосвязь с внутриклеточной концентрацией проникающих веществ и макромолекул. Модель показывает, что увеличение концентрации макромолекул в клетках путем увеличения концентрации непроникающих внеклеточных веществ позволяет существенно снизить концентрацию проникающих в клетку веществ, обеспечивающих при замораживании внутриклеточную витрификацию. Возможность сосуществования внутриклеточной витрификации и внеклеточных кристаллов льда была подтверждена экспериментально криомикроскопически при замораживании ооцитов мыши со скоростью 100 град/мин в условиях, когда внеклеточный раствор содержал 5 М этиленгликоля и от 0,3 до 0,6 М NaCl [31]. Таким образом, вышеупомянутая модель дает возможность аналитически рассчитать оптимальное соотношение концентрации непроникающих и проникающих в клетку веществ, позволяющее при наличии внеклеточного льдообразования контролировать безопасный размер внутриклеточных кристаллов льда или же перевести внутриклеточный раствор в стеклообразное состояние.

В связи с возросшей необходимостью создания криобанков тканей для трансплантации фундаментальные исследования в области криобиологии сконцентрированы на решении проблемы криоконсервирования биологических систем более высокого уровня организации [21]. Ткани представляют собой многослойную, организованную в определенном порядке конфигурацию различных типов клеток, взаимодействующих между собой. Низкотемпературная реакция клеток в тканевых структурах, кластерах клеток, культуральных монослоях количественно отличается от реакции клеток в суспензии [48]. В связи с этим при разработке методов криокон-

сервирования таких сложных систем должны рассматриваться дополнительные биофизические феномены, связанные с взаимодействием клетка-клетка, клетка-субстрат, геометрические эффекты, ограничение тепло- и массопереноса. Особое внимание в этом направлении исследований уделяется изучению механизма распространения льда во взаимосвязанной структуре клеток [16, 17, 36, 37].

Экспериментальные данные указывают на два вида образования внутриклеточного льда в таких системах: случайный процесс без участия соседних клеток и неслучайный процесс, при котором лед в одной клетке инициирует образование льда в соседней. Неслучайный процесс образования внутриклеточного льда в тканевых структурах убедительно подтвердила кинетика его распространения в эпидермальной ткани луковицы, зафиксированная скоростной видеосъемкой [54]. P.J. Acker с соавт. [19], используя статистический подход, показали, что вероятность образования внутриклеточного льда в контактирующих клетках возрастает, если одна из них уже закристаллизовалась. В литературе обсуждается два механизма неслучайного распространения внутриклеточного льда между соседними клетками. Первый – это механизм нуклеации, катализируемый плазматической мембраной [53, 54]. Согласно этому механизму лед в закристаллизовавшейся клетке рассматривается как внеклеточный по отношению к соседней, а белки плазматической мембраны, взаимодействуя с внеклеточным льдом, выступают как катализаторы внутриклеточного зародышеобразования. Второй механизм предложен W.K. Berger и B. Uhrik [23], в соответствии с которым распространение льда происходит через щели в плазматических мембранах в местах соединения клеток, т. е. с участием так называемого коннексин-коннексин комплекса. Эти щели представляют собой межклеточные поры, позволяющие клеткам обмениваться небольшими молекулами. Диаметр поры является функцией структуры щелевого контакта и чрезвычайно зависит от субкомпонентов коннексина. Диаметр поры специфичен для различного типа клеток и колеблется от 8 Å для коннексина-45 и до 24 Å для человеческого коннексина-37 [55]. W.K. Berger и B. Uhrik [23] экспериментально показали, что распространение льда от клетки к клетке в ткани слюнной железы насекомого существенно сдерживалось, если межклеточные соединения блоки-

ровали химическими агентами динитрофенолом и гептанолом. Кроме того, они установили, что существует температура, выше которой межклеточное распространение льда не наблюдается. Таким образом, авторы подтвердили правомочность теории водной поры P. Mazur и существование критического радиуса кристалла льда, способного прорасти сквозь межклеточную пору, а также механизма гетерогенной нуклеации внеклеточным льдом [5, 7, 8, 11] для взаимосвязанных клеточных структур. С целью проверки гипотезы распространения внутриклеточного льда с участием щелей плазматических мембран в местах межклеточных соединений P.J. Acker с соавт. [16] провели теоретическое и экспериментальное исследование температурной зависимости этого процесса. Определяя депрессию точки замерзания (ΔT) воды в капилляре как функцию радиуса поры для различных контактных углов θ, авторы промоделировали условия распространения льда через щели межклеточного контакта и показали, что при радиусе поры 7,5 Å и контактном угле θ более 80° лед будет распространяться через поры, если $\Delta T \sim 10$°C, а при радиусе поры 12 Å и аналогичном контактном угле – при $\Delta T \sim 5$°C. Это означает, что при увеличении размера межклеточной поры и контактного угла между стенкой поры и межфазной границей «лед-вода» повышается температура, при которой реализуется данный механизм распространения льда во взаимосвязанных клеточных структурах. Из проведенного теоретического анализа также следует, что существует верхний предел температуры, при которой радиус равновесного кристалла может быть достаточно велик, чтобы он мог пройти через пору. В экспериментальных исследованиях P.J. Acker с соавт. [16] сравнили кинетику распространения льда в трех системах: конфлуентных монослоях фибробластов хомяка V-79W, в которых при стандартных условиях культивирования клеток щели в местах межклеточных соединений отсутствуют, и конфлуентных монослоях эпителиальных клеток почки собаки Madin-Darby (MDCK), в которых в стандартной среде культивирования межклеточные щели формируются и не формируются при снижении концентрации Ca^{2+} в среде культивирования до 5 мкмоль/л. Монослои клеток на покровных стеклах охлаждали в криомикроскопе со скоростью 25 град/мин до различных субнулевых температур и при изотер-

мических условиях наблюдали кинетику межклеточного распространения льда. Анализ криомикроскопических исследований показал, что в монослоях клеток MDCK, имеющих контактные щели, образование льда в клетке при температуре ниже –3°С инициировало образование льда во всех соседних клетках и его дальнейшее распространение по монослойному полю. В то же время в монослоях клеток MDCK без контактных щелей, монослоях клеток V-79W и монослоях клеток MDCK, имеющих контактные щели, при температуре выше –3°С клетки могли оставаться незамерзшими даже в том случае, когда в соседней клетке уже образовался лед. Отсюда следует, что лед между клетками активно распространяется тогда, когда имеются контактные щели и температура в образце ниже –3°С. Эта температура находится в пределах температурного ряда теоретически предсказанного понижения точки замерзания в капилляре и может рассматриваться как критическая, при которой равновесный радиус кристалла соизмерим с размером щели межклеточного контакта и, следовательно, в монослоях клеток возможно физическое распространение внутриклеточного льда. Для количественной оценки целостности плазматических мембран при межклеточном распространении льда авторы [16, 18] использовали технику одновременного окрашивания монослоев клеток двумя флуоресцентными красителями SYTO 13 и этидиумом бромидом (EB) перед замораживанием. Контроль состояния клеток в монослоях на различных стадиях процесса замораживания показал, что целостность плазматических мембран в процессе межклеточного распространения льда с участием межклеточных щелей не нарушается. Таким образом, во взаимосвязанных клеточных структурах межклеточные щели, безусловно, облегчают распространение льда. Однако характер распространения льда в системах, подобных конфлуентным монослоям V-79W, в которых межклеточные щели отсутствуют, указывает на существование механизмов, не требующих их участия. В этом случае не исключается механизм формирования ядра льда на внутриклеточной плазматической мембране [53, 54] и, возможно, существование принципиально других механизмов.

P.J. Acker с соавт. [16] представили механистическую модель распространения льда через межклеточные щели, которая пред-

сказывает существование критического переохлаждения цитоплазмы, при превышении которого термодинамически возможно межклеточное распространение льда. Однако значения этих критических переохлаждений, безусловно, зависят от структуры межклеточной щели и биофизических свойств коннексина, многие из которых не известны. Кроме того, P.J. Acker с соавт. [16] проанализировали только равновесное состояние и не пытались моделировать кинетику процесса межклеточного распространения льда. D. Irimia и J.O.M. Karlsson [36] разработали теоретическую модель замораживания ткани, которая описывает кинетику распространения льда в двухклеточной системе. Эта модель предполагает, что внутриклеточный лед в любой клетке в пределах ткани является результатом комбинации двух независимых стохастических процессов: самопроизвольного образования внутриклеточного льда (например, благодаря внутриклеточной нуклеации или прорыва мембраны) и межклеточного распространения льда. И если последний механизм зависит от присутствия льда в соседних клетках, то первый не зависит от такого взаимодействия. Для теоретического описания кинетики внутриклеточного льдообразования в «ансамбле» пар клеток была получена цепная модель Маркова, прогнозирования которой хорошо согласуются с экспериментальными данными образования внутриклеточного льда в двухклеточной микромодели культуры клеток гепатомы человека линии HepG2, которая экспрессирует коннексин-32 и формирует межклеточные щели. Для выяснения роли межклеточных контактных щелей в распространении льда был использован известный блокатор 18b-глицирретиновая кислота, который, как считают, связывает коннексин межклеточных щелей, вызывая конформационные изменения и закрытие поры. Образцы охлаждали в криомикроскопе со скоростью 130 град/мин до –60°C. Для контроля состояния клеток в процессе замораживания использовали флуоресцентный краситель SYTO 13. Экспериментально оценивали время Δt инерционности процесса распространения льда между клетками. При наличии межклеточных контактных щелей в клетках HepG2 время инерционности процесса указывало на существование двух механизмов распространения: быстрого ($\Delta t < 0{,}3$ с) и медленного ($0{,}3 \text{ с} < \Delta t < 5$ с). Блокирование межклеточных кон-

тактных щелей приводило к увеличению времени инерционности процесса до $\Delta t \leq 20$ с и было сравнимо со временем задержки процесса нуклеации в единичных клетках. Полученные данные подтвердили активное участие межклеточных контактных щелей в распространении льда, способствующих прорастанию кристаллов льда через межклеточные поры или формированию узла гетерогенного образования зародыша льда на одной стороне соединения посредством конформационных изменений на противоположной стороне соединения, инициируемых внутриклеточным льдом. Характер же распространения льда в системах, в которых межклеточные щели были разрушены или блокированы, подтверждает гипотезу существования механизмов межклеточного распространения льда, не зависящих от межклеточных каналов. В пользу подобных представлений об эпитаксиальном механизме процесса кристаллизации свидетельствуют результаты экспериментов, проведенных в нашем отделе, по замораживанию контактирующих друг с другом везикул из общих липидов мембран эритроцитов человека, адсорбированных на границе вода/гептан [7] (рис. 1).

Для предсказания кинетики внутриклеточного льдообразования в одномерной модельной конструкции ткани, состоящей из четырех клеток, была разработана более сложная теоретическая модель [37], которая учитывает все возможные варианты состояний контактирующих клеток (заморожена/незаморожена) в линейном массиве клеток. Экстраполируя результаты моделирования на большие тканевые системы, состоящие из любого числа клеток, авторы продемонстрировали, что для быстро охлажденных тканей межклеточное распространение льда является доминирующим механизмом внутриклеточного льдообразования. Однако чтобы полностью понять механизмы распространения льда в сложных тканевых структурах и разработать теоретические модели, позволяющие оптимизировать протоколы их замораживания, необходимо исследовать характер зависимости скорости межклеточного распространения льда от температуры и содержания воды в клетках. Попытка решить такую задачу для тканевых структур была предпринята A. Zhang с соавт. [57], которые разработали математическую модель транспорта воды в тканевой структуре клеток рака молочной железы. Тканевая структура была пред-

ставлена ими в виде трехмерного кластера, клетки в котором упакованы в четыре концентрических сферических слоя. Моделируя различные температурные условия, были изучены дегидратация клеток и внутриклеточное льдообразование в такой структуре с учетом межклеточных контактов. Анализ показал, что клетки во внутренних слоях почти не обезвоживаются, в то время как удаленные от центра клетки обезвоживаются в значительной степени. Однако корректность уравнений, описывающих процесс межклеточного распространения льда, полученных A. Zhang с соавт. [57], была подвергнута критике J.O.M. Karlsson [38], указавшего на ошибочность принятых авторами упрощающих предположений, в частности о мгновенном распространении межклеточного льда в кластерах клеток. Таким образом, для комплексного понимания низкотемпературного ответа сложных неоднородных клеточных систем, какими являются тканевые структуры, необходимы дальнейшие фундаментальные как теоретические, так и экспериментальные исследования.

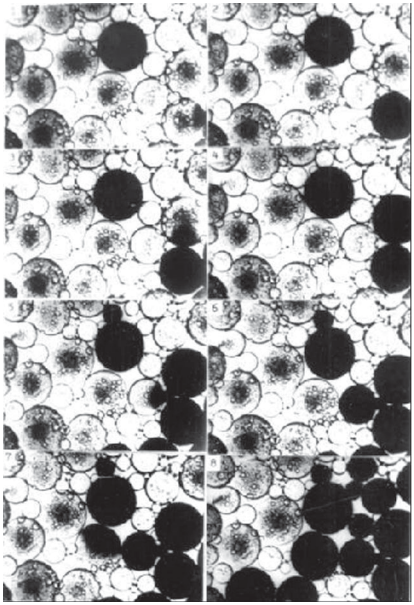


Рис. 1. Кинетика процесса инициирования внутриклеточного льда в липосомах в местах бислойного липидного контакта.

Фазовый переход «вода-лед» в клеточной суспензии сопровождается последовательной цепочкой физико-химических явлений, вызывающих повреждение клеток в температурной зоне формирования внеклеточных кристаллов льда, к которым, прежде всего, следует отнести дегидратацию и внутриклеточную кристаллизацию [6].

Разность химических потенциалов вне и внутри клетки, возникающая при образовании и росте внеклеточных кристаллов, является не только термодинамической силой, вызывающей обезвоживание клеток, но и мерой пересыщения внутриклеточного раствора по отношению к внеклеточному, от которой зависит вероятность образования кристаллов льда внутри клеток [49]. Количество льда в клетке и степень эффективного переохлаждения цитоплазмы в процессе кристаллизации зависят от скорости охлаждения, поверхностно-объемного отношения и гидравлической проницаемости клеток.

При поиске способов снижения вероятности повреждения клеток факторами, вызванными внеклеточным льдообразованием, мы использовали эмбрионы мышей ранних стадий развития, поскольку эти клетки имеют большие размеры (диаметр ооцитов мыши составляет около 70 мкм), и их реакция весьма наглядна.

Плазматические мембраны эмбрионов млекопитающих характеризуются низкой проницаемостью для молекул воды [41, 43]. В связи с этим оптимальные скорости охлаждения эмбрионов составляют 0,1–0,5 град/мин [20, 50, 56]. При скоростях охлаждения выше 0,5 град/мин возрастает вероятность внутриклеточного льдообразования. Проникающие в эмбрионы молекулы криопротекторов, замещая или частично связывая внутриклеточную воду, снижают вероятность образования внутриклеточных кристаллов, способствуют уменьшению размеров кристаллов льда, что коррелирует с повышением сохранности клеток после размораживания.

Известно, что эмбрионы мышей на ранних стадиях развития чувствительны к действию различных физико-химических факторов [2], что может быть обусловлено высокой интенсивностью в них процессов синтеза. На стадии двух бластомеров осуществляется переход контроля от материнского генома к эмбриональному [24], в связи с чем резко увеличивается интенсивность белкового синтеза и появляются характерные белки [25]. На этой стадии эмбрионального развития начинается также синтез РНК. Возможно, именно по этим причинам криоконсервирование эмбрионов мышей на ранних стадиях развития является весьма сложной задачей.

Мы изучили один из способов адаптации клеток к замораживанию – влияние предварительного обезвоживания эмбрионов мышей

ранних стадий развития и их насыщения высокой концентрацией проникающего криопротектора на вероятность внутриклеточного льдообразования [6, 9].

Материалом исследований служили одно- и двухклеточные эмбрионы мышей линии СВА. Различный уровень дегидратации клеток достигали экспозицией эмбрионов в течение 10 мин при 22°С в 0,5 и 1,0 М растворах сахарозы или NaCI. Насыщение эмбрионов проникающим криопротектором этиленгликолем (ЭГ) проводили путем ступенчатого повышения его концентрации в среде инкубации [15]. На первом этапе эмбрионы выдерживали 10 мин в растворе 1,8 М ЭГ, а затем на 1,5 мин переносили в среду замораживания, представляющую смесь 100% ЭГ и 1,0 М сахарозы в соотношении 3:7 (т. е. криозащитная среда содержала 5,37 М ЭГ и 0,7 М сахарозы) [3]. Уровень дегидратации клеток в исследуемых средах контролировали методом волюмометрии. Растворы готовили на физиологической среде Дюльбекко. Предварительную дегидратацию и насыщение клеток криопротектором проводили на эмбриональных стеклах под микроскопом МБС-9. Затем 2–3 эмбриона со средой инкубации переносили в специально сконструированную ячейку, которую помещали в рабочую камеру криомикроскопа [4]. Ячейка предохраняла препарат от высыхания и обеспечивала оперативный поиск клеток в поле зрения. Суспензию клеток охлаждали со скоростью 5 град/мин до –30°С. Для исключения переохлаждения в ячейку вносили затравочные кристаллы AgJ. Температуру контролировали в рабочей камере криоприставки. Скорость отогрева составляла 5 град/мин.

При замораживании зигот мыши в физиологической среде Дюльбекко (рис. 2) фазовый переход происходит одновременно во вне- и внутриклеточной среде (рис. 2, б). Внеклеточный лед представляет собой мелкокристаллическую структуру, которая рекристаллизуется при дальнейшем понижении температуры (рис. 2, в). Рекристаллизационные процессы внутри клетки отсутствуют. Постепенное просветление зигот на этапе отогрева свидетельствует об укрупнении внутриклеточных кристаллов (рис. 2, г). В зоне интенсивного плавления (рис. 2, д) полное исчезновение внутриклеточного льда предшествует плавлению внеклеточного кристаллического матрикса. Повреждение зигот прослеживается

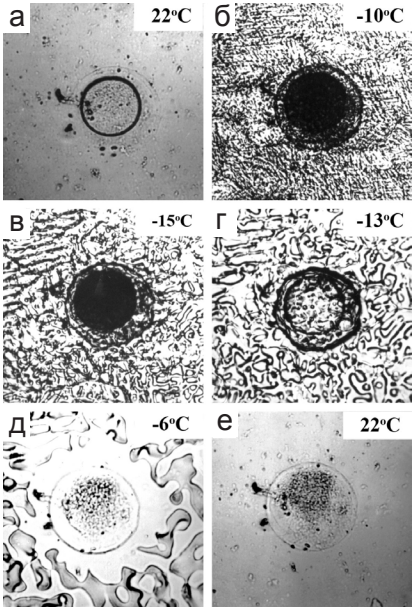


Рис. 2. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в физиологической среде Дюльбекко: а – интактная клетка; б, в – охлаждение; г–е – отогрев, ×100.

сразу же после плавления внутриклеточных кристаллов (рис. 2, д) и сопровождается полным разрывом плазматических мембран, а также выходом внутриклеточного содержимого из клетки (рис. 2, е). Аналогичные эффекты наблюдаются и при замораживании в физиологической среде двухклеточных эмбрионов мышей. Таким образом, внутриклеточная кристаллизация в незащищенных зиготах и двухклеточных эмбрионах, возникающая на этапе замораживания, при отогреве вызывает значительные деструктивные изменения клеток, затрагивающие цитоматрикс и клеточную мембрану.

Предварительное обезвоживание зигот мышей в растворах 0,5 и 1,0 М NaCl (рис. 3, 4) приводит к уменьшению их объема максимум в 2 раза (рис. 3, а, б; 4, а, б). Охлаждение клеток в данных растворах сопровождается разрыхлением цитоматрикса зигот и незначительным увеличением их объема, который при температуре ниже 0°С составляет 0,60 от исходного объема. Фазовый переход в растворах NaCl, как и в среде Дюльбекко, происходит одновременно как во вне-, так и во внутриклеточной среде. В растворе 0,5 М NaCl льдообразование сопровождается образованием мелких кристаллов (рис. 3, в), в то время как в растворе 1,0 М NaCl формируются разнонаправленные линейные структуры (рис. 4, в). Рекристаллизационные процессы в обоих случаях приводят к укрупнению кристаллических зерен (рис. 3, г; 4, г). При отогреве зигот мышей повреждения их плазма-

тических мембран наблюдаются сразу же после завершения плавления внутриклеточных кристаллов льда (рис. 3, ж; 4, ж).

Как видно, после замораживания в растворе 0,5 М NaCl цитоматрикс зиготы хотя и сохраняет некоторую компактность, однако имеет неправильные очертания, и единичные гранулы выходят из клетки (рис. 3, ж). В то же время после замораживания в растворе 1,0 М NaCl отмечается полная дезорганизация внутриклеточных структур зиготы (рис. 4, ж). После отогрева при температуре 22°С *zona pellucida* в 0,5 М растворе NaCl визуально ос-тается неповрежденной (рис. 3, з), в то время как в растворе 1,0 М NaCl она полностью разрушается (рис. 4, з). По-видимому, повреждения ранних эмбрионов мышей связаны не только с образованием внутриклеточных кристаллов льда, но и с непосредственным длительным химическим воздействием высоких концентраций электролита на клеточные структуры.

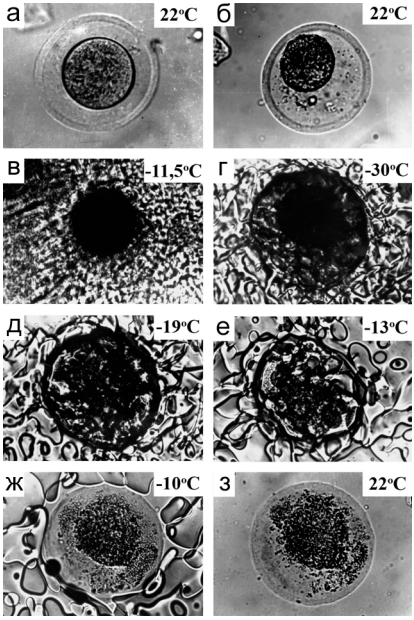


Рис. 3. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в растворе 0,5 М NaCl: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в 0,5 М растворе NaCl; в, г – охлаждение; д–з – отогрев, ×100.

В растворах 0,5 и 1,0 М сахарозы уровень обезвоживания зигот и двухклеточных эмбрионов ниже, чем в растворах NaCl (рис. 5, б; 6, б; 7, б), что вполне естественно, поскольку эти растворы менее осмотически активны. При охлаждении клеточной суспензии до температуры льдообразования размер и морфология дегидратированных клеток сохраняются. Фазовый переход во внеклеточном растворе сопровождается формированием мелкокристаллической

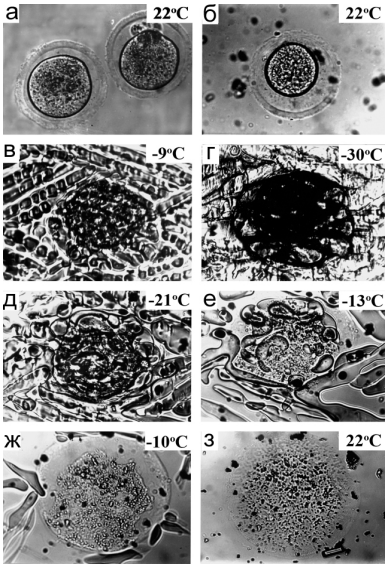


Рис. 4. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в растворе 1,0 М NaCl: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в растворе 1,0 М NaCl; в, г – охлаждение; д–з – отогрев, ×100.

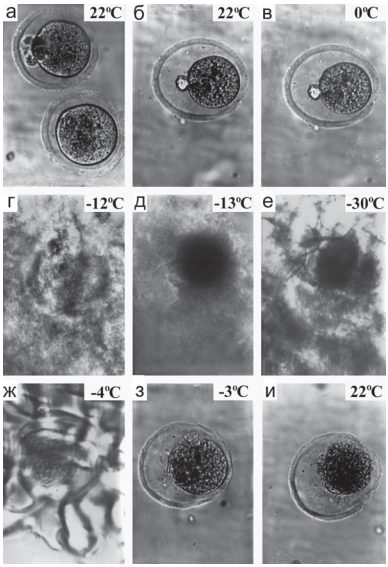


Рис. 5. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в растворе 0,5 М сахарозы: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в растворе 0,5 М сахарозы; в–е – охлаждение; ж–и – отогрев, ×100.

структуры (рис. 5, г; 6, в; рис. 7, в), что обусловлено повышенной вязкостью криозащитной среды, содержащей сахарозу. По сравнению с солевым раствором при замораживании в сахарозных средах как зигот, так и двухклеточных эмбрионов отмечается смещение значения температуры внутриклеточного фазового перехода относительно температуры кристаллизации во внеклеточном растворе. Переохлаждение цитоплазмы составляет не более 1°C (рис. 5, д; 6, г; 7, г). Важно отметить, что внутриклеточная кристаллизация в двухклеточных эмбрионах происходит в результате последовательного закристаллизовывания бластомеров, что является следствием как различной степени переохлаждения их цитоплазмы, так и вероятностного характера внутриклеточного льдообразования (рис. 6, в, г). На этапе отогрева в зоне фазового

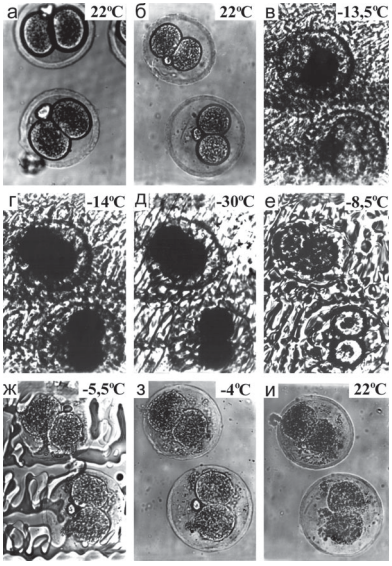


Рис. 6. Кинетика замораживания-оттаивания двухклеточных эмбрионов мыши в растворе 0,5 М сахарозы: а – интактные клетки; б – обезвоживание двухклеточных эмбрионов мыши в растворе 0,5 М сахарозы; в–д – охлаждение; е–и – отогрев, ×100.

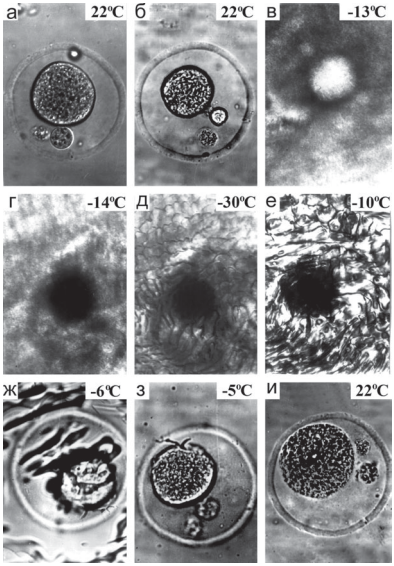


Рис. 7. Кинетика замораживания-оттаивания зиготы мыши в растворе 1,0 М сахарозы: а – интактная клетка; б – обезвоживание зиготы мыши в растворе 1,0 М сахарозы; в–д – охлаждение; е–и – отогрев, ×100.

перехода «лед-вода» плавление внутриклеточных кристаллов льда завершается закономерно быстрее, чем внеклеточных кристаллов (рис. 5, ж; 6, ж; 7, ж). Повреждения зигот и двухклеточных эмбрионов, замороженных в растворах 0,5 М сахарозы, отмечаются еще в области плавления внеклеточных кристаллов (рис. 5, ж; 6, ж) и усугубляются по мере повышения температуры (рис. 5, з; 6, з). При температуре 22°С *zona pellucida* зигот имеет нерегулярные границы, а плазматические мембраны – локальные разрывы. Тем не менее, внутриклеточное содержимое зигот остается компактным (рис. 5, и). При повреждении двухклеточных эмбрионов мыши наблюдаются потеря границ между бластомерами, множественные разрывы плазматических мембран и нарушение компактности гранулоплазмы (рис. 6, з, и).

В зиготах, замороженных в растворах 1,0 М сахарозы (рис. 7), после плавления внутриклеточных кристаллов грубые повреждения плазматической мембраны отсутствуют. Однако по мере повышения температуры отмечается постепенное набухание клеток. Так, уже при –5°С объем зиготы сравним с объемом интактной клетки (рис. 7, з), а при 22°С он превышает его в 1,27 раза. Морфологически внутриклеточное содержимое выглядит несколько разрыхленным. Видимых повреждений *zona pellucida* и плазматической мембраны не наблюдается (рис. 7, и). Двухклеточные эмбрионы, замороженные в растворе 1,0 М сахарозы, имеют такие же характерные морфологические повреждения, как и при замораживании в растворе 0,5 М сахарозы.

Таким образом, предварительное обезвоживание мышиных эмбрионов ранних стадий развития в растворах непроникающих веществ (сахароза и NaCl) не позволяет предотвратить внутриклеточную кристаллизацию, которая неизбежно приводит к выраженным повреждениям клеток. В связи с этим было исследовано сочетанное воздействие двух факторов: одновременное обезвоживание и насыщение эмбрионов мышей проникающим криопротектором в высококонцентрированных растворах. В качестве криозащитного раствора была применена криоконсервирующая среда на основе ЭГ и сахарозы.

Этиленгликоль в высоких концентрациях обеспечивает витрификацию как вне- так и внутриклеточной среды и поэтому успешно используется для криоконсервирования различными методами ооцитов и эмбрионов многих млекопитающих [32, 33]. Смесь сахарозы и ЭГ оказалась эффективной при замораживании эмбрионов пони [34]. Одним из преимуществ ЭГ является его наименьшая токсичность по сравнению с другими проникающими криопротекторами. Этот факт подтвержден Mukaida T. и соавт. [45] при исследовании влияния проникающих криопротекторов (ДМСО, ЭГ, 1,2-пропандиола, глицерина и ацетамида), входящих в состав витрифицирующейся смеси (40% проникающего криопротектора + 30% Ficoll + сахароза), на сохранность деконсервированных эмбрионов. Максимальная сохранность клеток была достигнута после использования ЭГ и глицерина. Как считают авторы [45], все другие криопротекторы в таких высоких концентрациях оказывают токси-

ческое действие на внутриклеточные органеллы эмбрионов, нарушая функции последних. Установлено, что эмбрионы мышей выдерживают экспозицию до 5 мин в растворе 7,0 М ЭГ и после криоконсервирования в этом растворе методом витрификации успешно развиваются в культуре до стадии расширенной бластоцисты [22, 47]. Ооциты мышей, в отличие от эмбрионов, выдерживают лишь непродолжительную экспозицию в растворе 7,0 М ЭГ, а экспозиция более 5 мин в растворах ЭГ с концентрацией выше 4,0 М приводит к формированию мембранных пузырей (блебов) и нарушению распределения микрофиламентов [35].

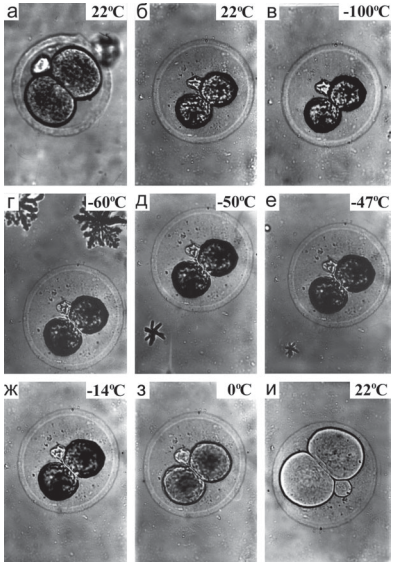


Рис. 8. Кинетика замораживания-оттаивания двухклеточного эмбриона мыши в этиленгликоль-сахарозной среде: а – интактная клетка; б – обезвоживание двухклеточного эмбриона мыши в этиленгликоль-сахарозной среде; в – охлаждение; г–и – отогрев, ×100.

Исходя из вышеизложенного, попытка использовать при подготовке к замораживанию эмбрионов мышей ранних стадий развития в качестве дегидратирующего раствора высокоосмотичную среду на основе 5,37 М ЭГ и 0,7 М сахарозы явилась вполне обоснованной. Это позволило уменьшить объем клетки, при котором она входила в процесс замораживания, до 0,40 исходного объема, одновременно частично заместив внутриклеточную воду проникающим криопротектором.

Кинетика замораживания двухклеточного эмбриона мыши в криозащитной смеси представлена на рис. 8. Видно, что охлаждение эмбрионов мыши до температуры –100°С не сопровождается видимыми изменениями как во внеклеточной, так и во внутриклеточной средах. Криозащитная смесь остается оптически прозрачной, а бластомеры сохраняют исходную оптическую плотность

(рис. 8, в), что свидетельствует об отсутствии рассеивающих свет частиц в виде кристаллических зерен как во вне-, так и во внутриклеточной среде. Этот факт дает основание считать, что данная криозащитная смесь способна стекловаться. Однако на этапе отогрева в области температур –62…–60°С во внеклеточной среде регистрируется немногочисленное высыпание кристаллических зародышей в виде дендритных розеток (рис. 8, г). При дальнейшем повышении температуры кристаллические структуры, не успев развиться, постепенно расплавляются (рис. 8, д, е), что исключает вероятность непосредственного контакта клеток с образовавшимися кристаллами льда. Эмбрионы сохраняют свою морфологию в области отрицательных температур вплоть до 0°С (рис. 8, ж). При температуре 0°С и выше отмечается постепенное просветление бластомеров, сопровождающееся увеличением их размера (рис. 8, з). При достижении 22°С объем бластомеров превосходит интактный практически в 1,22 раза, что свидетельствует о проникновении внеклеточного раствора в клетки (рис. 8, и). Тем не менее граница между бластомерами остается четкой, а плазматическая мембрана и *zona pellucida* не имеют разрывов.

Таким образом, исследования процесса замораживания эмбрионов мышей ранних стадий развития показали, что наиболее эффективным способом исключения повреждений клеток, обусловленных кристаллообразованием, является применение криозащитной среды, содержащей 5,37 М ЭГ и 0,7 М сахарозы, склонной к стеклованию даже при медленных скоростях охлаждения (5 град/мин). Формирование кристаллической структуры, наблюдаемое в данной среде при отогреве, не является опасным и его можно полностью исключить прохождением этого температурного интервала с несколько большей скоростью, чем в наших исследованиях.

Указанная этиленгликоль-сахарозная среда была использована в нашем отделе при криоконсервировании двухклеточных эмбрионов мышей в пластиковых соломинках методом прямого погружения в жидкий азот [12]. Клетки к замораживанию готовили согласно рекомендациям Кривохарченко А.С. и соавт. [3]. Соломинки отогревали 20 с на водяной бане при 37°С. Культивирование клеток в условиях *in vitro* показало, что после размораживания жизнеспо-

собными по морфологическим признакам остаются не менее 60% эмбрионов.

Ранее нами был получен алгоритм определения оптимальных с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения режимов охлаждения [10, 13]. Среднее время образования зародыша внутриклеточного льда зависит от пересыщения протоплазмы замораживаемых клеток следующим образом:

$$\langle t \rangle_i = \frac{A}{\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2} exp\left\{\frac{B}{\left(\hat{T}\right)^3\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2}\right\}, \qquad (1)$$

где A и B – константы,

$$B = \frac{\pi 10^4 \upsilon_i^{\,2}\sigma^3}{81\left(kT_{\acute{e}0}\right)^3 c_{\acute{e}0}^{\,2}};$$

υ_i – объем молекулы воды в кристаллической фазе; σ – коэффициент поверхностного натяжения границы раздела твердой и жидкой фаз; k – постоянная Больцмана; $T_{\acute{e}0}$ – абсолютная температура, при которой завершается плавление внеклеточного раствора; $c_{\acute{e}0}$ – суммарная мольная доля растворенных во внеклеточной среде веществ при температуре плавления внеклеточного раствора $T_{\acute{e}0}$;

$$\hat{\tilde{c}} \equiv \frac{\tilde{c}}{c_{\acute{e}0}};\ \tilde{c}\left(\hat{T}\right) -$$

концентрация внеклеточного раствора, при которой он находится в термодинамическом равновесии со льдом при температуре T;

$$\hat{T} = \frac{T}{T_{\acute{e}0}} -$$

приведенная температура; T – текущее значение абсолютной температуры;

$$\hat{c}_{in} = \frac{c_{in}}{c_{\hat{e}\,0}} -$$

приведенная концентрация растворенных веществ во внутриклеточном растворе; c_{in} – текущее значение суммарной мольной доли растворенных внутри клетки веществ.

Согласно выражению (1) вероятность образования внутриклеточного кристалла льда в единицу времени в пересыщенном внутриклеточном растворе

$$W_1 = \frac{1}{\langle t \rangle_i} = \frac{\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2}{A} exp\left\{-\frac{B}{\hat{T}^3\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2}\right\}. \qquad (2)$$

Поэтому вероятность образования внутриклеточного кристалла льда в пересыщенном внутриклеточном растворе за время кристаллизации внеклеточного раствора определяется интегралом по времени t от момента времени $t_{\kappa 0}$ начала кристаллизации во внеклеточном растворе до момента t_E, при котором температура внеклеточного раствора становится равной его эвтектической температуре:

$$W^* = \int_{t_{k\,0}}^{t_E} W_1 dt\,. \qquad (3)$$

Оптимальным с точки зрения предотвращения повреждения клеток внутриклеточными кристаллами льда является режим охлаждения T(t), при котором вероятность внутриклеточной кристаллизации минимальна по сравнению с другими режимами охлаждения, т. е.

$$W^{*} = \int_{t_{k0}}^{t_E} \frac{\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2}{A} exp\left\{-\frac{B}{\hat{T}^3\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2}\right\} dt \to min. \quad (4)$$

Поскольку в рамках двухфакторной теории криоповреждения образование кристалла льда в клетке неминуемо приводит к ее гибели, вероятность W^* можно отождествить с вероятностью гибели клеток за счет внутриклеточной кристаллизации. Кроме того, поскольку в замораживаемой клеточной суспензии, как правило, количество клеток очень велико, можно рассматривать их совокупность как статистический ансамбль и отождествить вероятность W^* с частью клеток, которые повреждаются на этапе кристаллизации клеточной суспензии в результате внутриклеточного льдообразования.

Повреждение клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии обусловлено не только образованием внутриклеточных кристаллов льда, но и так называемыми эффектами раствора, вследствие которых повреждение клеток усиливается с повышением концентрации раствора, контактирующего с клеточными структурами, и временем экспозиции клеток в нем. Одной из самых простых зависимостей вероятности криоповреждения клеток на этапе кристаллизации эффектами раствора, учитывающей две указанные характерные особенности действия этого фактора на криоконсервируемые биологические объекты, является следующая:

$$W^{**} = \frac{1}{2D} \int_{t_{k0}}^{t_E} (\hat{c}_{in}\hat{\tilde{c}})dt. \quad (5)$$

Определенная таким образом вероятность повреждения клеток эффектами раствора, очевидно, увеличивается при более длительном их действии. Выбор подынтегрального выражения в виде произведения концентраций внутри- и внеклеточного растворов учитывает то обстоятельство, что структурные и функциональные элементы клетки повреждаются как в результате непосредствен-

ного контакта внешней поверхности мембраны клетки с окружающим ее внеклеточным раствором, так и повреждения субклеточных структур окружающим их внутриклеточным гипертоническим раствором.

Биологический смысл константы D в выражении (5) состоит в следующем: она равна длительности экспозиции клеток в криозащитном растворе при температуре его плавления, после которой жизнеспособность утрачивают 50% клеток.

Поскольку эффекты раствора и внутриклеточная кристаллизация повреждают клетки независимо друг от друга, вероятность W повреждения клеток на этапе кристаллизации при замораживании клеточной суспензии равна сумме указанных вероятностей (4) и (5): $W = W^* + W^{**}$. При заданной постоянной скорости охлаждения

$$\frac{dT}{dt} = -\beta \left(\beta \succ 0\right)$$

получаем:

$$W = -\frac{T_{\hat{e}0}}{\beta A}\int_1^{\hat{T}_E}\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2 exp\left\{-\frac{B}{\hat{T}^3\left[\hat{\tilde{c}}\left(\hat{T}\right) - \hat{c}_{in}\right]^2}\right\}d\hat{T} -$$

$$-\frac{T_{\hat{e}0}}{2D\beta}\int_1^{\hat{T}_E}\hat{c}_{in}\hat{\tilde{c}}d\hat{T} = min, \qquad (6)$$

где константы A и D выражены в единицах времени, а скорость охлаждения β – К/мин.

Величина $W \cdot 100\%$, очевидно, определяет процент поврежденных в процессе кристаллизации суспензии клеток.

На основании полученного выражения было рассчитано значение оптимальной скорости охлаждения для модельного объекта – суспензии дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* в растворе «ДМСО (10 объемных %) – 0,135 М NaCl – вода». По биофизичес-

ким и геометрическим параметрам замораживаемых клеток [14], диаграмме плавления криозащитного раствора и уравнению (6) при помощи стандартных компьютерных программ можно рассчитать, как изменяются концентрация и пересыщение внутриклеточного раствора, а также процент клеток, который повреждается при снижении температуры в процессе замораживания. Как следует из результатов расчета, в диапазоне скоростей охлаждения ≤ 3 град/мин криоповреждение клеток происходит только за счет эффектов раствора и определяется интегралом (4), а при скоростях охлаждения ≥ 6 град/мин – преимущественно в результате внутриклеточной кристаллизации. Зависимость суммарного вклада этих факторов в криоповреждение клеток имеет сравнительно широкий минимум в диапазоне скоростей охлаждения 4…8 град/мин (рис. 9). Таким образом, оптимальной постоянной скоростью охлаждения на этапе кристаллизации при замораживании суспензии микроорганизмов *S. cerevisiae* под защитой 10%-го раствора ДМСО является скорость охлаждения около 4 град/мин. Эта теоретическая оценка согласуется с известными экспериментальными данными [26, 42].

Предложенный нами алгоритм теоретической оценки оптимального значения скорости охлаждения при линейном режиме замораживания конкретной клеточной суспензии, очевидно, может быть использован при разработке способов криоконсервирования других биологических объектов.

В настоящее время для криоконсервирования клеточных суспензий наряду с методами, при которых охлаждение замораживаемого биообъекта на этапе кристаллизации происходит с постоянной скоростью,

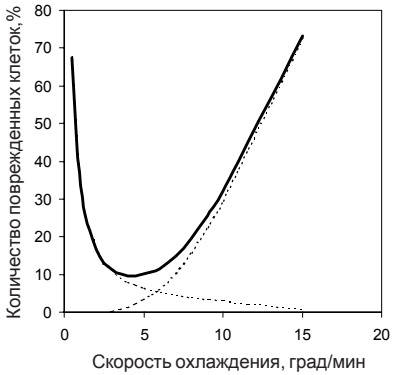


Рис. 9. Процент клеток, повреждающихся за счет суммарного действия эффектов раствора и внутриклеточной кристаллизации, в зависимости от скорости охлаждения при замораживании суспензии микроорганизмов *S. cerevisiae* в растворе «ДМСО (10%) – 0,135 М NaCl – вода».

успешно применяют так называемые быстрые двухступенчатые программы замораживания. Эти программы замораживания состоят из трех этапов:

1) охлаждение клеточной суспензии от температуры $T_{к0}$, при которой в суспензии начинается внеклеточное льдообразование, до температуры T_A, находящейся между температурой $T_{к0}$ и эвтектической температурой внеклеточного раствора T_E;

2) изотермическая экспозиция клеток (при температуре T_A) в течение 5–30 мин;

3) быстрое охлаждение биообъекта путем непосредственного его погружения в жидкий азот.

Практическая реализация этого режима замораживания состоит в том, что контейнер с замораживаемой клеточной суспензией погружается в предварительно охлажденный до умеренно низкой температуры T_A жидкий хладоагент, экспонируется при этой температуре в течение 5–30 мин, а затем погружается в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Для ответа на вопрос, почему быстрое двухступенчатое замораживание клеточной суспензии не менее эффективно, чем охлаждение, осуществляемое с постоянной оптимальной скоростью, и определения особенностей данного режима замораживания с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения, рассмотрим предельно идеализированный режим двухступенчатого охлаждения клеточной суспензии на этапе ее кристаллизации (рис. 10). Пусть в области, где находится некоторая клетка в замораживаемом образце, температура изменяется вдоль отрезков прямых AB-BC-CD. В начальный момент времени $t_{к0}$, который соответствует началу кристаллизации в окружающем клетку водном растворе, температура скачкообразно изменяется от значения $T_{к0}$ до значения T_A (A→B), а затем поддерживается при постоянном значении T_A в течение времени $t_A – t\kappa_0$ (B→C). После этого температура снова мгновенно понижается до температуры жидкого азота T_N (C→D). Значение температуры T_A, получившей название «температура адаптации», находится в диапазоне от температуры начала льдообразования в замораживаемой клеточной суспензии до эвтектической температуры внеклеточного раствора T_E.

Вид представленной на рис. 10 идеализированной программы охлаждения, очевидно, оправдывает ее название – ступенчатое охлаждение. На первый взгляд, ступенчатый режим замораживания полностью противоречит общепринятому представлению о существовании определенного оптимального для каждого биологического объекта значения постоянной скорости охлаждения на этапе кристаллизации, которое имеет достаточно глубокое теоретическое обоснование в виде двухфакторной теории криоповреждения и неоднократное экспериментальное подтверждение.

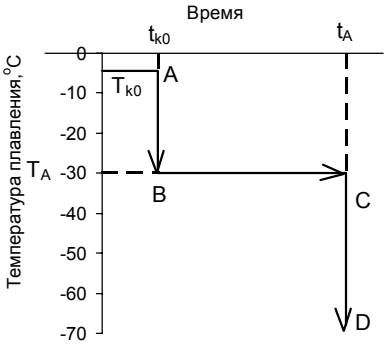


Рис. 10. Термограмма идеализированного двухступенчатого режима замораживания.

Действительно, в моменты времени $t_{к0}$ и $t_{А}$ скорость охлаждения бесконечно велика и в бесконечное количество раз превышает оптимальное с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения значение, а в промежутке времени $t_{к0}...t_{А}$ обращается в ноль, то есть имеет значение, в бесконечное количество раз меньшее, чем оптимальная скорость охлаждения. Тем не менее криозащитную эффективность такого режима охлаждения можно объяснить, исходя из общепринятых представлений о том, что при оптимальном режиме охлаждения клеточной суспензии на этапе ее кристаллизации отсутствует внутриклеточное льдообразование наряду с минимально возможным при этом условии повреждением клеток за счет их контакта с раствором, физико-химические характеристики которого в процессе замораживания клеточной суспензии значительно отличаются от нормальных значений.

Для объяснения криозащитного эффекта быстрых двухступенчатых режимов замораживания, которые применяются на практике, рассмотрим представленный на рис. 11 идеализированный режим охлаждения суспензии *S. cerevisiae* в растворе ДМСО на этапе ее кристаллизации.

Пусть на участках OA, BC, DE и FQ клеточная суспензия охлаждается со скоростью 15 град/мин, то есть со скоростью, явно большей, чем оптимальная. Предположим также, что при температурах –15, –25 и –35°C охлаждение прекращается и клеточная суспензия выдерживается при каждой из указанных температур в течение соответствующих промежутков времени t_B–t_A, t_D–t_C, t_F–t_E.

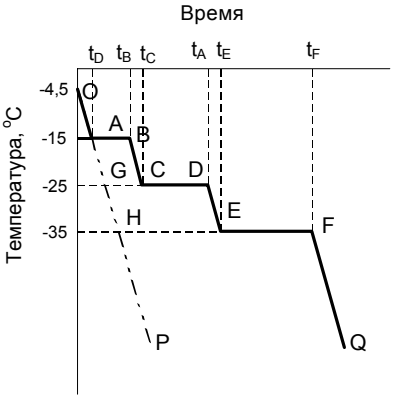


Рис. 11. Идеализированный многоступенчатый режим охлаждения клеточной суспензии.

Проанализируем процессы, которые протекают на этапе кристаллизации клеточной суспензии при многоступенчатом режиме охлаждения. Пусть $\tilde{c} = \tilde{c}(T)$ – кривая плавления внеклеточного раствора, тогда при температуре T в термодинамическом равновесии с внеклеточным льдом находится раствор, концентрация которого равна $\tilde{c}(T)$. Поскольку термодинамическое равновесие между внеклеточными кристаллами льда и окружающим их внеклеточным раствором устанавливается быстро, можно считать, что в процессе замораживания клеточной суспензии концентрация раствора $\tilde{c}$, который находится между кристаллами внеклеточного льда, при любой температуре T равна $\tilde{c}(T)$. В процессе кристаллизации клеточной суспензии клетки вытесняются в жидкую фазу, замкнутую между кристаллами льда, и, следовательно, при каждом значении температуры T находятся в гипертоническом растворе с концентрацией $\tilde{c}(T)$. По мере снижения температуры в каждой точке замораживаемого образца концентрация окружающего клетку жидкого раствора повышается так, что точка (T, $\tilde{c}$), отображающая состояние внеклеточного раствора, движется вдоль кривой плавления. Поэтому при замораживании клеточной суспензии концентрация внеклеточного раствора в каждый момент времени при данной температуре T равна $\tilde{c}(T)$. С учетом этого обстоятельства пере-

сыщение внутриклеточного раствора при замораживании клеток совпадает с разностью концентраций между вне- и внутриклеточным растворами.

Анализ процессов массопереноса через клеточную мембрану в рассматриваемом случае показывает, что изменение пересыщения внутриклеточного раствора, то есть разницы концентраций между внеклеточным и внутриклеточным растворами, в течение промежутка времени t_B–t_A, t_D–t_C, t_F–t_E описывается решением уравнения трансмембранного переноса [1]:

$$ln\frac{x\hat{c}_{in}(0)}{\left[\hat{\hat{c}}(T_A)-\hat{c}_{in}(0)\right]\left[\hat{\hat{c}}(T_A)-x\right]}+\hat{\hat{c}}(T_A)^2\frac{t-t_0}{(1-\alpha)}\gamma L_P(T_A)\pi_0+$$

$$+\hat{\hat{c}}(T_A)\left[\frac{\hat{\hat{c}}(T_A)-\hat{c}_{in}(0)-x}{\hat{c}_{in}(0)\left[\hat{\hat{c}}(T_A)-x\right]}\right]=0, \qquad (7)$$

в которое введено обозначение: $x\equiv\hat{\hat{c}}(T_A)-\hat{c}_{in}$ – приведенное пересыщение внутриклеточного раствора, при этом время релаксации пересыщения внутриклеточного раствора равно:

$$\tau_w=\frac{(1-\alpha)}{\gamma L_P(T_A)\pi_0\hat{\hat{c}}(T_A)^2}, \qquad (8)$$

где γ – поверхностно-объемное отношение клетки; L_p – коэффициент фильтрации клеточной мембраны; T_A –– температура адаптации.

Используя данные о геометрических и транспортных характеристиках, фигурирующих в выражении (8), для конкретных клеток, например для одноклеточных микроорганизмов *S. cerevisiae*, закон Аррениуса и диаграмму плавления внеклеточного раствора, можно получить зависимость τ_w от температуры изотермической стадии процесса ступенчатого замораживания для данных клеток.

Расчеты показывают, что быстрое многоступенчатое охлаждение с остановками при дискретном наборе температур ($i = 1, 2, ..., n$) на время порядка

$$\tau_{Ai} = \frac{\tilde{c}\left(T_{Ai}\right)}{\left(1-\alpha\right)}\tau_w\left(T_{Ai}\right) = \frac{\tilde{c}\left(T_{Ai}\right)^2}{\gamma L_P\left(T_{Ai}\right)R_0 T_{Ai}\tilde{c}\left(T_{Ai}\right)\left(1-\alpha\right)} \qquad (9)$$

при многоступенчатом режиме охлаждения приводит к нескольким небольшим всплескам пересыщения, недостаточных для повреждения большого количества клеток. На стадиях охлаждения OA, BC, DE и FQ (рис. 11) пересыщение возрастает, а при температурах адаптации –15, –25, –35°C резко снижается (рис. 12). Необходимо, чтобы на этапе каждой температурной остановки пересыщение внутриклеточного раствора замораживаемых клеток упало до нуля. Иначе после температурной остановки оно может оказаться настолько большим, что могут образоваться внутриклеточные кристаллы льда и повредить клетки. Очевидно, при каждой следующей более низкой температуре адаптации в ряду –15, –25, –35°C длительность температурной остановки должна быть больше, чем на предыдущей остановке, поскольку характерное время трансмембранного переноса воды, которое определяет кинетику снижения степени пересыщения внутриклеточного раствора, экспоненциально увеличивается со снижением температуры.

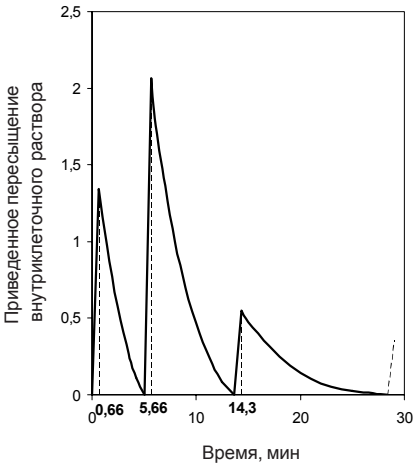


Рис. 12. Зависимость пересыщения внутриклеточного раствора дрожжевых грибов *S. cerevisiae* от времени на участках AB, CD и EF при замораживании в растворе «ДМСО 10% – 0,135 M NaCl – вода» по многоступенчатой программе.

На стадии многоступенчатого режима охлаждения FQ (см. рис. 11), несмотря на достижение большего пересыщения, внутриклеточные кристаллы не зарождаются и не растут из-за чрезвычайно высокой вязкости раствора криопротектора при температурах T_{TE} и высоких концентраций межкристаллического раствора, которые достигаются в области близких к эвтектическим температурам, поскольку повышение вязкости значительно затрудняет присоединение молекул воды к кристаллу льда из окружающего его водного раствора криопротектора. В пользу этого вывода свидетельствует тот факт, что при замораживании даже со сравнительно небольшими скоростями растворы криопротекторов с концентрацией, близкой к эвтектической, как правило, стеклуются.

Таким образом, проведенный теоретический анализ процесса замораживания суспензии клеток на стадии ее кристаллизации показывает, что наряду с оптимальным с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения линейным режимом охлаждения существует не менее эффективный многоступенчатый режим охлаждения, который также обеспечивает высокую сохранность клеток. Как правило, режим многоступенчатого охлаждения (см. рис. 11) практически реализовать трудно. Однако можно заметить, что в предельном случае большого количества ступенек режим многоступенчатого охлаждения OABCDEFQ переходит в режим охлаждения OP, который, как показано на рис. 13, проходит через середины всех ступенек. Такой режим охлаждения технически реализовать значительно проще, чем линейный режим охлаждения. Практически его можно осуществить погру-

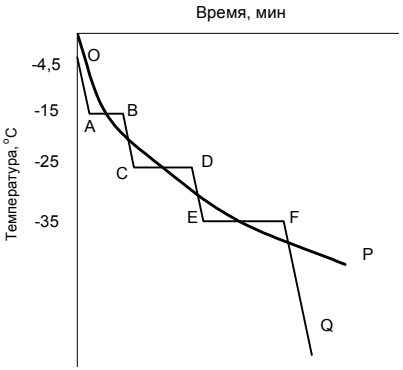


Рис. 13. Экспоненциальный режим охлаждения OP как граничный случай идеализированного многоступенчатого режима охлаждения при бесконечно большом количестве ступенек.

жением контейнера с клеточной суспензией в заранее охлажденную до определенной температуры жидкость.

Рассмотрим детальнее предельный переход от многоступенчатого режима охлаждения до соответствующего ему непрерывного нелинейного режима охлаждения. Для определения конкретного вида этого режима охлаждения рассмотрим две соседние температурные ступеньки, высота которых мала и равна (рис. 14).

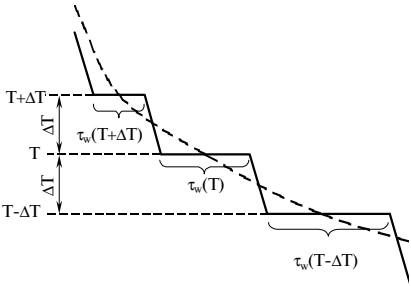


Рис. 14. Нелинейный режим охлаждения как предельный случай многоступенчатого режима охлаждения с увеличивающейся по мере снижения температуры длиной ступенек.

Длина каждой температурной ступеньки равна характерному времени τ_w, необходимому для выравнивания концентраций растворенных вне и внутри клетки веществ, то есть времени, за которое при температуре ступеньки пересыщение внутриклеточного раствора падает практически до нуля. Из простых геометрических соображений следует, что скорость охлаждения

$$\frac{dT}{dt} = -\beta$$

при температуре

$$T + \frac{1}{2}\Delta T$$

имеет вид:

$$\beta\left(T + \frac{1}{2}\Delta T\right) = \frac{\Delta T}{\frac{\tau_w(T+\Delta T)}{2} + \frac{\tau_w(T)}{2} + \frac{\Delta T}{s}},$$

где σ – постоянная скорость охлаждения на участках OA, BC, DE и FQ между ступеньками (см. рис. 13).

Аналогично при температуре

$$T-\frac{1}{2}\Delta T$$

имеем:

$$\beta\left(T-\frac{1}{2}\Delta T\right)=\frac{\Delta T}{\frac{\tau_w(T-\Delta T)}{2}+\frac{\tau_w(T)}{2}+\frac{\Delta T}{s}}\ .$$

Поскольку высота ступенек мала, приближенно получаем:

$$\beta(T)+\frac{1}{2}\frac{d\beta}{dT}(T)\Delta T=\frac{\Delta T}{\tau_w(T)+\frac{d\tau_w}{dT}(T)\Delta T+\frac{\Delta T}{s}}$$

и

$$\beta(T)-\frac{1}{2}\frac{d\beta}{dT}(T)\Delta T=\frac{\Delta T}{\tau_w(T)-\frac{d\tau_w}{dT}(T)\Delta T+\frac{\Delta T}{s}}$$

или

$$\frac{d\beta}{dT}=\frac{d\tau_w}{dT}\varphi,\ \varphi=-\frac{\beta}{\tau_w+\frac{\Delta T}{s}}\ . \qquad (10)$$

Исключая из этих равенств φ, в предельном случае $\Delta T\to 0$ получаем уравнение

$$\frac{d\ln\beta}{dT}=-\frac{d\ln\tau_w}{dT},$$

интегрирование которого дает:

$$\beta = \frac{const}{\tau_w}. \qquad (11)$$

Как видно, при этом режиме охлаждения, в отличие от линейного режима, скорость охлаждения является переменной. Равенство (11) имеет очень простое значение. По мере снижения температуры кристаллизующейся суспензии необходимо уменьшать скорость охлаждения таким образом, чтобы при каждом значении температуры клетка находилась в течение промежутка времени порядка τ_w, за который пересыщение внутриклеточного раствора успевает снизиться до близких к нулю значений.

Очевидно, $const = \beta_0 \tau_w \left(T_{\hat{e}0}\right)$, где β_0 – скорость охлаждения суспензии в момент начала внеклеточной кристаллизации. Для искомого предельного по отношению к многоступенчатому режиму охлаждения получаем следующую зависимость между температурой и временем

$$-\frac{T_{\hat{e}0}}{\beta}\int_1^{\hat{T}} \frac{exp\left[-\frac{E_{\grave{A}}}{RT_{\hat{e}0}}\left(1-\frac{1}{\hat{T}}\right)\right]}{\hat{\hat{c}}\left(\hat{T}\right)^2} d\hat{T} = -t. \qquad (12)$$

Зависимость (12) представлена графически на рис. 15 кривой, обозначенной светлыми кружками. Температура –31°С на этой кривой в соответствии с диаграммой плавления внеклеточного раствора соответствует более чем четырехкратному увеличению концентрации ДМСО в клеточной замораживаемой суспензии. При такой концентрации быстрое охлаждение раствора криопротектора, например, путем непосредственного погружения контейнера с биообъектом в жидкий азот приводит к его стеклованию. Следовательно, этап охлаждения FQ (см. рис. 13) не приводит к дополнительному по сравнению с предыдущими этапами повреждению клеток.

Таким образом, наряду с оптимальным с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения линейным режимом охлаждения, существует оптимальный нелинейный режим охлаждения, который приближенно может быть реализован путем погружения контейнера с замораживаемой клеточной суспензией в предварительно охлажденный до определенной температуры жидкостный термостат.

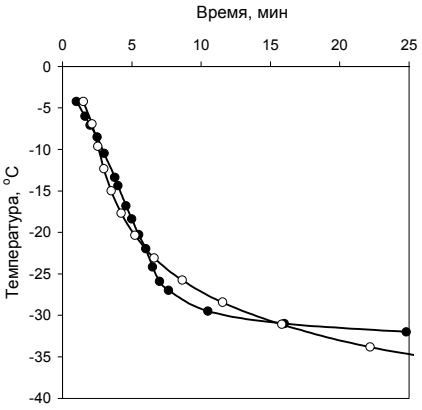


Рис. 15. Рассчитанный оптимальный нелинейный режим охлаждения суспензии дрожжевых грибов *S. cerevisiae* (кривая, обозначенная светлыми кружками) и близкий к нему экспериментально подобранный режим двухступенчатого замораживания (кривая с черными кружками).

Быстрый двухступенчатый режим замораживания имеет несколько очевидных преимуществ по сравнению с режимами, при которых скорость охлаждения не изменяется. Прежде всего, при двухступенчатом режиме охлаждения время контакта клеток с окружающим их гипертоническим раствором сравнимо с характерным временем переноса молекул воды через плазматические мембраны клеток и значительно меньше времени, необходимого для существенного повышения внутриклеточного содержания криопротектора в процессе замораживания.

Таким образом, проведенный теоретический анализ процесса замораживания суспензии клеток на стадии ее кристаллизации показывает, что наряду с оптимальным с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения линейным режимом охлаждения существует не менее эффективный двухступенчатый режим охлаждения, который обеспечивает высокую сохранность клеток. Замороженные по двухступенчатому режиму клетки при размораживании и последующем контакте с изотонической средой в меньшей мере подвергаются постгипертоническому лизису, чем клетки,

замороженные с медленной постоянной скоростью. Процедура реализации быстрого двухступенчатого замораживания существенно проще, чем замораживание с постоянной скоростью, которое осуществляется программными замораживателями.

Как показано в наших исследованиях, наиболее эффективным способом исключения повреждений клеток, обусловленных вне- и внутриклеточным кристаллообразованием, оказывается сочетание поэтапного предварительного обезвоживания и насыщения клеток проникающим криопротектором, что обеспечивает стеклование криозащитной среды и внутриклеточного содержимого.

Литература

1. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Марущенко В.В., Сакун О.В. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини // Біофіз. вісник. – 2008. – Вип. 21, №2. – С. 75–80.
2. Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену: В 2 т. – М: Москва, 1983. – Т. 1. – 357 с.
3. Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Серобян Г.А. и др. Выживаемость эмбрионов мышей после сверхбыстрого замораживания разными способами с использованием различных криопротекторов // Проблемы репродукции. – 1995. – №4. – С. 13–18.
4. Кулешова Л. Г. Криомикроскопический комплекс для криобиологических исследований // Цитология. – 2004. – Т. 46, №9. – С. 809–810.
5. Кулешова Л.Г. Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах : Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1983. – 220 с.
6. Кулешова Л.Г. Механизмы действия внеклеточного льдообразования и связанных с ним явлений на биологические объекты: Дис. … докт. биол. наук . – Харьков, 2011. – 385 с.
7. Кулешова Л.Г., Новиков А.Н., Олейник С.Т. Исследование механизма инициирования внутриклеточного льдообразования // Биофизика. – 1988. – Т. XXXIII, вып. 5. – С. 845–849.
8. Кулешова Л.Г., Новиков А.Н., Пичугин Ю.И. Участие проникающих криопротекторов в процессе внутриклеточного льдообразования // Биофизика. – 1985. – Т. XXX, вып. 1. – С. 82–87.
9. Кулешова Л.Г., Пишко О.В. Криомикроскопический анализ замораживания эмбрионов мыши ранних стадий развития // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №2. – С. 117–224.
10. Марущенко В.В., Гордиенко Е.А. Зависимость вероятности внутриклеточного льдообразования от уровня пересыщения в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae* // Біофіз. вісник. – 2009. – Вип. 22, №1. – С. 80–85.
11. Новиков А.Н., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Моделирование процесса внутриклеточной кристаллизации // Биофизика. – 1980.– Т. XXV, вып. 1. – С. 129–133.
12. Пишко О.В. Осмотическое поведение ооцитов и эмбрионов мыши на различных этапах криоконсервирования: Дис. … канд. биол. наук . – Харьков, 2005. – 140 с.
13. Сакун О.В., Гордієнко О.І. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії // Біофіз. вісник. – 2009. – Вип. 22, №1. – С. 123–129.
14. Сакун О.В., Марущенко В.В., Коваленко І.Ф. та ін. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №1. – С. 41–48.

15. Смольянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В. Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мыши // Проблемы криобиологии. – 2001. – №2. – С. 49–55.
16. Acker J.P., Elliott J.A.W., McGann L.E. Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores // Biophys. J. – 2001. – Vol. 81, №3. – P. 1389–1397.
17. Acker J.P., Larese A., Yang H. et.al. Intracellular ice formation is affected by cell interactions // Cryobiology. – 1999. – Vol. 38, №4. – P. 363–371.
18. Acker J.P., McGann L.E. Cell-cell contact affects membrane integrity after intracellular freezing // Cryobiology. – 2000. – Vol. 40, №1. – P. 54–63.
19. Acker J.P., McGann L.E. The role of cell-cell contact on intracellular ice formation // CryoLetters. – 1998. – Vol. 19, №6. – P. 367–374.
20. Agca Y. Cryobiology of embryos, germ cells, and ovaries // ILAR Journal. – 2000. – Vol. 41, №4. – P. 207–220.
21. Bakhach J., Casoli V., Guimberteau J.C. The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary of our own experiments // Ann. Chir. Plast. Esthet. – 2007. – Vol. 52, №5. – P. 531–47.
22. Bautista J.A., Takahashi Y., Kanagawa H. In vitro viability of mouse zygotes vitrified in ethylene glycol // Jpn. J. Vet. Res. – 1998. – Vol. 45, №4. – P. 193–198.
23. Berger W.K., Uhrik B. Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary glands // Experientia. – 1996. – Vol. 52, №9. – P. 843–850.
24. Clegg K.B., Piko L. Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos // J. Embryol. Exp. Morph. – 1983. – Vol. 74. – P. 169–182.
25. Conover J.E., Temeles G.L., Zimmermann J.W, Burke B., Schultz R.M. Stage-specific expression of a family of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryo // Dev. Biol. – 1991. – Vol. 144, №2 – P. 392–404.
26. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates // Appl. Environ Microbiol. – 2004. – Vol. 70, №1. – P. 268–272.
27. Edashige K., Sakamoto M., Kasai M. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos // Cryobiology. – 2000. – Vol. 40, №2. – P. 171–175.
28. Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans F.W., Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation // Biol. Reprod. – 2003. – Vol. 68, №1. – P. 87–94.
29. Hagedorn M., Lance S.L., Fonseca D.M. et.al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation // Biol. Reprod. – 2002. – Vol. 67, №3. – P. 961–966.
30. Hagedorn M., Peterson A., Mazur P., Kleinhans F.W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option // Cryobiology. – 2004. – Vol. 49, №2. – P. 181–189.
31. Han X., Critser J.K. Measurement of the size of intracellular ice crystals in mouse oocytes using a melting point depression method and the influence of intracellular solute concentrations // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, №3. – P. 302–307.
32. Hochi S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses // J. Reprod. Dev. – 2003. – Vol. 49, №1. – P. 13–21.
33. Hochi S., Fujimoto T., Braun J., Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification // Theriogenology. – 1994. – Vol. 42, №3. – P. 483–488.
34. Hochi S., Maruyama K., Oguri N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose // Theriogenology. – 1996. – Vol. 46, №7. – P. 1217–1224.
35. Hotamisligil S., Toner M., Powers R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol // Biol. Reprod. – 1996. – Vol. 55, №1. – P. 161–168.
36. Irimia D., Karlsson J.O.M. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct // Biophys. J. – 2002. – Vol. 82, №4. – P. 1858–1868.

37. Irimia D., Karlsson J.O.M. Kinetics of intracellular ice formation in one-dimensional arrays of interaction biological cells // Biophys. J. – 2005. – Vol. 88, №1. – P.647–660.
38. Karlsson J.O.M. Theoretical analysis of undirectional intercellular ice propagation in stratified cell clusters // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, №3. – P. 357–361.
39. Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Borel Rinkes I.H.M. et al. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide // Biophys. J. – 1993. – Vol. 65, №6. – P. 2524–2536.
40. Koseoglu M., Eroglu A., Toner M., Sadler K.C. Starfish oocytes form intracellular ice at unusually high temperatures // Cryobiology. – 2001. – Vol. 43, №23. – P. 248–259.
41. Leibo S.P., Mazur P., Jackowski S.C. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing // Exp. Cell. Res. – 1974. – Vol. 89, №1 – P. 79–88.
42. Lepock J.R., Keith A.D., Kruuv J. Permeability changes in years after freeze-thaw damage: comparison to reproductive survival // CryoLetters. – 1984. – Vol. 5, №4. – P. 277–280.
43. Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability // Cell Biophys. – 1984. – Vol. 6, №3. – P. 197–213.
44. Mazur P., Seki S., Pinn I.L. et al. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes // Cryobiology. – 2005. – Vol. 51, №1. – P. 29–53.
45. Mukaida T., Wada S., Takahashi K. et al. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos // Hum. Reprod. – 1998. – Vol. 13, №10. – P. 2874–2879.
46. Muldrew K., McGann L.E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury // Biophys. J. – 1994. – Vol. 66, №2, Pt. 1. – P. 532–541.
47. Nowshari M.A., Brem G. Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure /// Theriogenology. – 1998. – Vol. 50, №7. – P. 1001–1013.
48. Pegg D.E. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissue and organs // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, №3 – P. S 36–S 44.
49. Pushkar N.S., Rozanov L.F., Gordienko E.A., Kuleshova L.G. Role of osmotic factors in cell injury during freeze-thawing of cell suspensions // The Society for Low Temperature Biology: International Meeting. University of Leuven, 19–23th July, 1994: Proceedings.– Leuven (Belgium), 1994.– P. 22.
50. Shaw J.M., Oranratnachai A., Trounson A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue // Theriogenology. – 2000. – Vol. 53, №1. – P. 59–72.
51. Shimada K., Asahina E. Visualization of intracellular ice crystals formed in very rapidly frozen cells at –27°C // Cryobiology. –1975. – Vol. 12, №3. – P. 209–218.
52. Tanghe A., Van Dijck P., Dumortier F.et al. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68, №12. – P. 5981–5989.
53. Toner M., Cravalho E.G., Karel M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells // J. Appl. Phys. – 1990. – Vol. 67. – P. 1582–1593.
54. Tsuruta T., Ishimoto Y., Masuoka T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis // Ann. N.-Y. Acad. Sci. – 1998. – Vol. 858. – P. 217–226.
55. Veenstra R.D. Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins // J. Bioenerg. Biomembr. – 1996. – Vol. 28, №4. – P. 327–337.
56. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing // Life Sci. – 1972. – Vol. 11, №22, P. II. – P. 1071–1079.
57. Zhang A., Xu L.X., Sandison G.A., Zhang J. A microscale model for prediction of breast cancer cell damage during cryosurgery // Cryobiology. – 2003. – Vol. 47, №2. – P. 143–154.

Биофизические подходы к исследованию влияния низких температур на биомакромолекулы

О.А. Нардид*, Е.Д. Розанова, А.В. Зинченко,
М.И. Щетинский, Е.И. Науменко, С.В. Репина

Отдел криобиофизики
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: olnard@mail.ru*

В последние годы среди основных биотехнологических достижений, в том числе и в Украине, все большее значение приобретает криоконсервирование различных биологических объектов с последующим использованием в медицине, сельском хозяйстве, микробиологии, генетике и других областях [1, 8]. Дальнейшее усовершенствование существующих и создание новых криобиологических технологий имеют важное народнохозяйственное и социальное значение. Для успешного решения таких задач необходима подробная информация о физико-химических процессах в биообъектах, зависящих от взаимодействий в системе на этапах криоконсервирования.

Внутри- и межмолекулярные взаимодействия определяют конформацию отдельных биомакромолекул, которая влияет на выполняемые ими функции, обеспечивает их устойчивость и надмолекулярную организацию [3].

Условия, в которых находятся биомакромолекулы на различных этапах криоконсервирования, могут оказывать существенное влияние, по крайней мере, на третичную и четвертичную конформацию белка. Это обусловлено тем, что при криоконсервировании

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 45–72.
© О.А. Нардид, Е.Д. Розанова, А.В. Зинченко и др., 2012

Используемые сокращения
1,2-ПД – 1,2-пропандиол
16-ДС – 16-доксилстеариновая кислота
ДМСО – диметилсульфоксид
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
ГОД – глюкозооксидаза
САБ – сывороточный альбумин быка
САЧ – сывороточный альбумин человека
СКК – сыворотка кордовой крови
ТЕМПОН – 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксипиперидин-1-оксил
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ФЖ – фолликулярная жидкость
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
ЭПЧ – экстракт плаценты человека

как гидрофобные взаимодействия, так и водородные связи, определяющие и стабилизирующие третичную и четвертичную структуры, могут изменяться в зависимости от pH, ионной силы, состава, диэлектрической постоянной среды.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию естественных белковых смесей со стандартными концентрациями белков и составом среды. К таким смесям относятся плазма или сыворотка крови, фолликулярная жидкость, белковые экстракты различных биологических тканей и т. п. В последнее время такие белковые растворы часто используются в клинических целях [9, 10, 17, 18, 23, 41]. Например, сыворотка кордовой крови (СКК) человека содержит более 60 специфических белков, ряд пептидов, витаминов и микроэлементов, поэтому ее широко применяют для корректировки и лечения патологических состояний человека, но ее длительное хранение возможно только в условиях низкотемпературного банка [18].

Исследование влияния режимов замораживания на конформационную динамику белков сыворотки методом ЭПР спиновых зондов показало [11], что в зависимости от использованных режимов замораживания-отогрева СКК получают разные температурные зависимости параметров конформационной динамики белков сыворотки (рис. 1).

Для исследования динамической структуры СКК авторы применяли метод ЭПР спиновых зондов [20], используя гидрофильный спиновый зонд ТЕМПОН, а также стеариновую кислоту, спинмеченую в 16 положении вдоль гидрофобной цепи (16-ДС), что

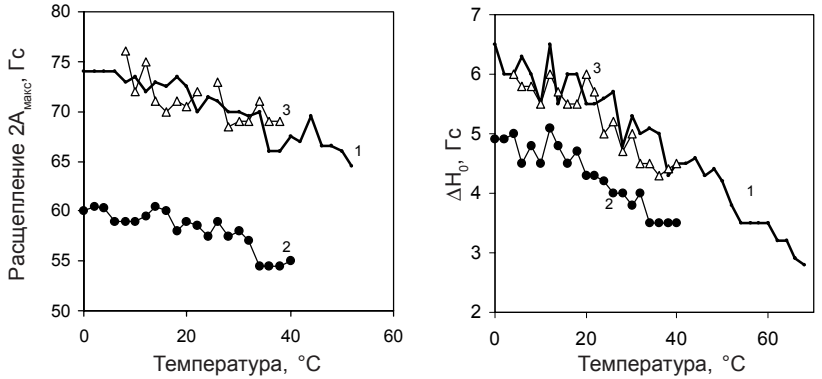


Рис. 1. Температурные зависимости максимального расщепления (а) и ширины (б) спектров ЭПР в СКК: 1 - контрольной; 2 - после замораживания со скоростью 1-2 град/мин до -20°С; 3 - после замораживания со скоростью 300-400 град/мин до -196°С.

позволило получить информацию о поведении как растворителя, так и, собственно, белков сыворотки. Из спектров ЭПР зонда ТЕМПОН определяли интенсивности центральной и боковой компонент триплета и оценивали параметр подвижности зонда. В качестве характеристик конформационной динамики сывороточных белков использовали параметр максимального расщепления ($2A_{макс}$) и значение ширины центральной компоненты спектра ЭПР зонда 16-ДС.

Разное действие на СКК различных режимов замораживания проявляется как в максимальном расщеплении, так и в ширине центрального компонента спектра ЭПР. Например, замораживание сыворотки кордовой крови до –20°С со скоростью 1–2 град/мин приводит к большим изменениям максимального расщепления и ширины центрального компонента спектра ЭПР зонда 16-ДС, свидетельствующим о значительной модификации динамической структуры белков, имеющей характер разрыхления. Используемый зонд связывается с поверхностными полостями белков, слабо доступными растворителю. Поэтому уменьшение максимального расщепления и ширины центрального компонента спектра ЭПР, характеризующее увеличение подвижности зонда, свидетель-

ствует о разрыхлении поверхностных полипептидных цепей макромолекул. Замораживание образцов сыворотки со скоростью 300–400 град/мин до –196°С практически не влияет на динамику микроокружения радикалов и является более щадящим для сывороточных белков.

Исследования сыворотки кордовой крови, проведенные методом калориметрии [6, 22], также свидетельствуют о нарушении конформации белковых молекул СКК после медленного замораживания до –20°С. Кривые теплопоглощения сыворотки кордовой крови регистрировали на прецизионном дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре DASM-4, позволяющем с большой точностью регистрировать кривые теплопоглощения и определять температуры термоденатурации белков СКК. Ошибки в определении температуры денатурации доминантных белков сыворотки T_d и ширины температурного интервала денатурации на полувысоте пика ΔT_d не превышали 1,0 и 0,5°С. На рис. 2 приведены кривые теплопоглощения СКК после использования разных режимов замораживания, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Из рис. 2 видно, что основной процесс теплопоглощения протекает в температурном интервале 40–100°С. Кривая теплопоглощения незамороженного образца характеризуется достаточно резким и интенсивным пиком (T_d = 62,5 ± 0,5°С, ΔT_d = 14 ± 1,0°С) и плечами при 66 и 72°С, а также слабо выраженным пиком при температуре 84 ± 0,5°С, ΔT = 10,5 ± 1,0°С. Известно, что обезжиренный альбумин и обезжиренный, но насыщенный жирными кислотами САЧ, денатурируют в одну стадию с параметрами переходов T_d = 60,5°С, ΔT_d = 14°С и T_d = 80°С, ΔT_d = 10,5°С.

Сравнение этих данных с результатами, приведенными на рис. 2 (кривая 1), свидетельствует, что температура, соответствующая максимуму основной стадии процесса денатурации сыворотки кордовой крови, совпадает с T_d обезжиренного альбумина, а стадия с T_d = 84 ± 0,5°С относится к T_d необезжиренного альбумина. Это дает основание предположить, что альбумин в составе СКК находится в основном в обезжиренном состоянии. Следовательно, можно утверждать, что его множественные центры связывания

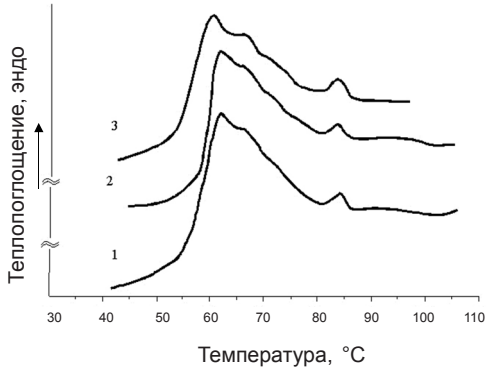


Рис. 2. Кривые теплопоглощения СКК человека: 1 – контроль; 2 – после замораживания со скоростью охлаждения 300–400 град/мин до –196°C и отогрева; 3 – после замораживания со скоростью охлаждения 1–2 град/мин до –20°C и отогрева.

практически свободны от лигандов и могут играть важную роль *in vivo* при различных отклонениях состава крови от нормы.

Как видно на рис. 2, при замораживании СКК с высокой скоростью (кривая 2) кривая теплопоглощения не изменяется, а после замораживания с низкой скоростью (кривая 3) пик денатурации обезжиренного альбумина смещается в область низких температур, что свидетельствует об изменении конформации поверхностных полипептидных цепей макромолекул, и, следовательно, о раннем процессе тепловой денатурации белков СКК.

Таким образом, замораживание СКК с использованием неблагоприятных режимов замораживания приводит к нарушению внутримолекулярных взаимодействий в биомакромолекулах, вследствие которого разрыхляются поверхностные полипептидные цепи.

Изучение влияния различных режимов замораживания и конечных температур на распределение белков сыворотки кордовой крови по молекулярным массам методом гель-хроматографии [21, 22] выявило и другие нарушения внутри- и межмолекулярных взаимодействий в этой белковой системе. Исследование влияния замораживания с низкими скоростями до –20°C на состав белков сыворотки кордовой крови показало, что максимумы на гель-хроматограмме смещены в область больших молекулярных масс, что может свидетельствовать об агрегации биомакромолекул сыворотки (рис. 3, кривая 6).

Учитывая, что основной вклад в гель-хроматограмму вносят альбумин, содержание которого в сыворотке превышает 50%, и иммуноглобулин G (10–25% от общего белка), можно предположить, что в частичной агрегации белков участвуют, в первую очередь, эти белки. Данными литературы подтверждено, что сывороточный альбумин и иммуноглобулин G могут формировать агрегаты при замораживании их в растворе [33, 39]. Однако снижение относительного содержания низкомолекулярных белков свидетельствует о том, что и они принимают участие в процессе агрегации. После охлаждения СКК до –80°С со скоростью 100 град/мин (рис. 3, кривая 3) характер кривой ее гель-хроматограммы близок к хроматограмме нативной сыворотки. Агрегирование в этом случае практически отсутствует. По крайней мере, основные по количеству белки плазмы (альбумин и иммуноглобулины) в агрегации не участвуют.

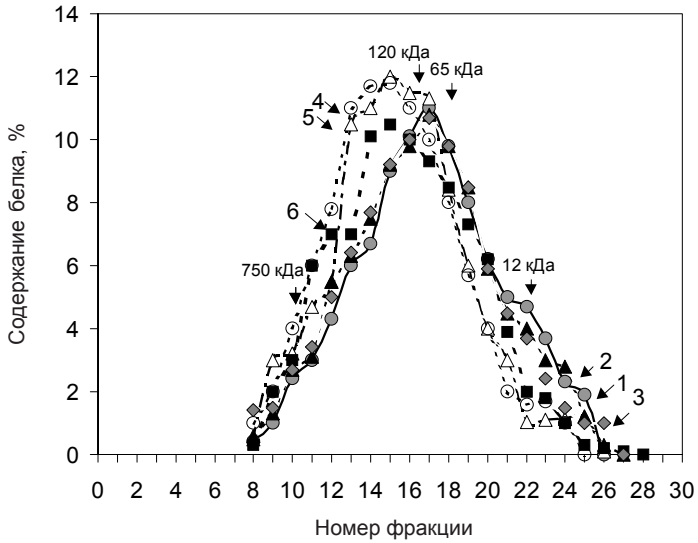


Рис. 3. Гель-хроматограммы нативной СКК (1) и СКК после замораживания-отогрева: 2 – замороженной до –80°С со скоростью охлаждения 300–400 град/мин; 3 – до –80°С со скоростью 100 град/мин; 4 – до –80°С со скоростью 35 град/мин; 5 – до –80°С со скоростью 1–2 град/мин; 6 – до –20°С со скоростью 1–2 град/мин.

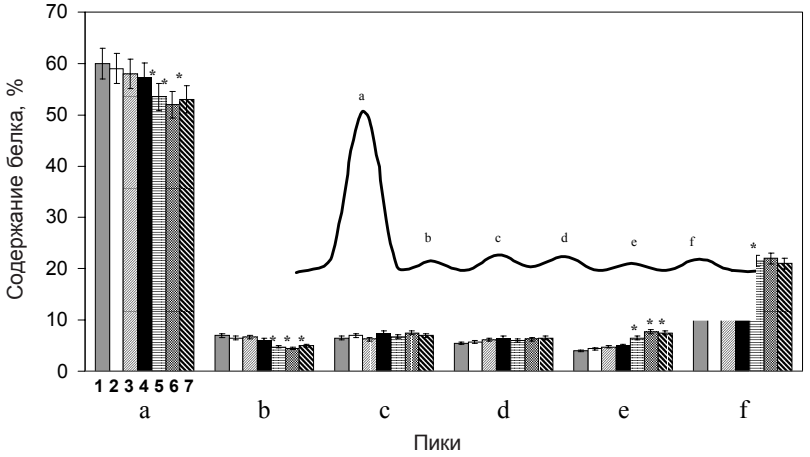


Рис. 4. Электрофореграмма СКК и содержание белков во фракциях электрофореграмм после разных режимов замораживания: 1 – нативная; 2 – замороженная до –196°С со скоростью охлаждения 300–400 град/мин; 3 – до –80°С со скоростью 300–400 град/мин; 4 – до –80°С со скоростью 100 град/мин; 5 – до –80°С со скоростью 35 град/мин; 6 – до –80°С со скоростью 2 град/мин; 7 – до –20°С со скоростью 2 град/мин; * – различия статистически достоверны по сравнению с нативной СКК (p < 0,05).

Результаты исследования влияния режимов замораживания и конечных температур на агрегацию белков сыворотки кордовой крови методом гель-хроматографии хорошо согласуются с данными изучения СКК, полученными методом гель-электрофореза [22] (рис. 4). После охлаждения сыворотки до –20 и –80°С с низкими скоростями увеличивается содержание высокомолекулярных белковых фракций сыворотки (пики *e* и *f*). При этом же режиме охлаждения уменьшаются фракции, содержащие белки с молекулярной массой 60–80 кДа (пики *a* и *b*). В то же время после охлаждения до –196°С со скоростью 300–400 град/мин и последующего отогрева сыворотки кордовой крови вид электрофореграмм не изменяется по сравнению с электрофореграммой нативной сыворотки.

Механизм образования агрегатов можно объяснить тем, что замораживание СКК при медленных скоростях приводит к раз-

рыхлению поверхностных полипептидных цепей белковых молекул [21, 22]. В результате формируется такая их конформация, при которой часть неполярных аминокислотных остатков белка переходит из внутренней области глобулы на ее поверхность. Сближение таких макромолекул в процессе вымораживания свободной воды приводит к взаимодействию их гидрофобных участков, обуславливая агрегацию биомакромолекул. Существует мнение, что агрегация белков в процессе замораживания-отогрева относится к поверхностно-индуцированным процессам и происходит в результате разворачивания белков на поверхностях раздела лед-вода и вода-воздух [28, 44]. При использовании высоких скоростей охлаждения агрегация отсутствует или значительно снижается. Это объясняют недостаточной степенью разрыхления, уменьшением времени нахождения системы в условиях, способствующих агрегации, а также снижением диффузии в граничные области.

Но даже при быстром замораживании, когда изменения макромолекул минимальны, методом СВЧ диэлектрометрии выявляются нарушения конформации биомакромолекул СКК [7]. Приведенные на рис. 5 данные подтверждают, что быстрое замораживание СКК значительно не влияет на количество связанной молекулами сыворотки воды, а значит и не приводит к их структурно-конформационным изменениям.

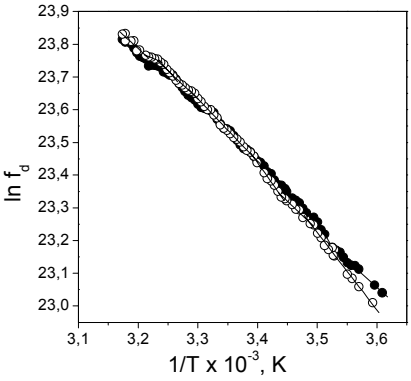


Рис. 5. Зависимости Аррениуса частоты диэлектрической релаксации диполей воды в СКК: ● – контроль; ○ – быстрое замораживание.

Наряду с этим частота диэлектрической релаксации диполей воды быстро замороженной сыворотки при температуре в области 10°С претерпевает излом. Ниже этой температуры значения частоты релаксации замороженной СКК (рис. 5) меньше, чем в контрольных образцах. Это свидетельствует о некотором затормаживании вращения диполей воды из-за их связывания в результате

нарушений конформации молекул СКК, но они значительно меньше, чем при медленном замораживании [7].

Аналогичные изменения частоты диэлектрической релаксации после быстрого замораживания наблюдали при исследовании конформационных нарушений биомакромолекул фолликулярной жидкости (ФЖ) [5, 31] (рис. 6).

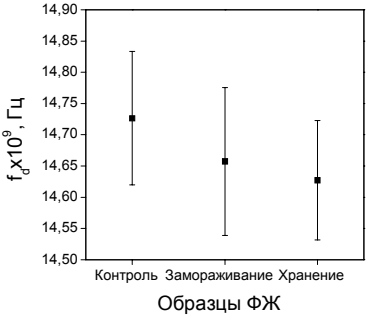


Рис. 6. Частота диэлектрической релаксации молекул воды нативной ФЖ (контроль), замороженной до –196°С и хранившейся 1 месяц.

Как и в случае с СКК, частота диэлектрической релаксации ФЖ уменьшается. Понижение f_d ФЖ при замораживании свидетельствует об уменьшении количества свободной воды в системе, что обусловлено появлением дополнительных участков связывания для молекул воды и может быть следствием изменения конформации биомакромолекул в результате изменения внутримолекулярных связей. Несмотря на небольшие отличия средних значений частоты диэлектрической релаксации ФЖ до и после замораживания-отогрева и большой разброс абсолютных значений параметра, можно утверждать, что средние значения f_d ФЖ, подвергнутой замораживанию и хранению, статистически достоверно ($p < 0,05$) понижаются по сравнению с контролем.

Подобные конформационно-структурные изменения биомакромолекул наблюдаются и в водно-солевых экстрактах плаценты человека (ЭПЧ) [24]. Данные, полученные методом гель-хроматографии, показали, что замораживание экстрактов с высокой скоростью до –196°С приводит к незначительным изменениям белкового профиля (рис. 7, А). После замораживания экстрактов с низкой скоростью охлаждения до –20°С и последующего отогрева отмечено более выраженное статистически значимое увеличение относительного содержания белков в области больших молекулярных масс, что, как отмечалось, можно объяснить агрегацией белков в экстрактах (рис. 7, Б). По изменению белкового профиля

можно определить, белки каких молекулярных масс преимущественно участвуют в образовании агрегатов. По-видимому, именно эти белки подвержены нарушениям внутримолекулярных взаимодействий, что вызывает достаточную степень разрыхления для образования агрегатов.

Подобные результаты были получены методами спектрофотометрии и ЭПР спиновых меток и зондов при исследовании гемоглобина, миозина, цитохрома Р-450 и других белков [4, 19, 26, 37]. Установлено, что замораживание и последующий отогрев приводят к изменению конформации биомакромолекул, иногда даже вблизи активных центров белков. Таким образом, внутримолекулярные взаимодействия в биомакромолекулах и их конформация, особенно поверхностных полипептидных цепей, достаточно лабильны к воздействию низких температур. Конформация и структура активных центров ферментов, в большинстве случаев расположенных внутри молекулы, не подвержены значительным изменениям, что и обеспечивает сохранность ферментативной активности после замораживания и последующего отогрева. Однако сложно определить, происходит ли криоденатурация белков

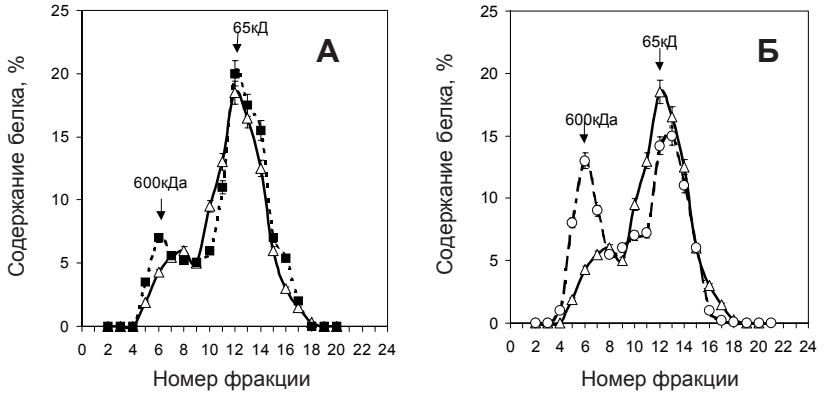


Рис. 7. Влияние замораживания при высоких (А) и низких (Б) скоростях охлаждения и последующего отогрева на белковый профиль ЭПЧ: △ – исходные ЭПЧ; ■ – ЭПЧ, охлажденные с высокой скоростью до –196°С; ○ – ЭПЧ, медленно охлажденные до –20°С.

в условиях глубокого охлаждения с последующей ренатурацией (отжигом) или белкам удается сохранить конформацию, близкую к нативной, и при температуре кипения сжиженного азота.

Современные проблемы медицинской и ветеринарной диагностики, охраны окружающей среды, контроля биотехнологических процессов, качества пищевых продуктов и питьевой воды обусловили необходимость разработки принципиально новых высокочувствительных, селективных, быстрых и экономичных аналитических систем, к которым относятся биосенсоры – гибридные системы нового поколения, объединяющие биоселективный элемент и физико-химический преобразователь [2, 15, 16, 34, 40]. В биосенсорах используют биологические структуры разного уровня организации: отдельные молекулы (ферменты, антитела или антигены, полинуклеотиды), надмолекулярные элементы (рецепторы), клетки, органы и даже целостные организмы. Однако из-за их относительной простоты наибольшее распространение в качестве биоселективного элемента получили различные ферменты. В этом отношении важным ферментом является глюкозооксидаза (ГОД), широко используемая в биосенсорах различных типов в качестве глюкометров. Этот водорастворимый белок представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц, с каждой из которых нековалентно связана молекула ФАД. Активный центр расположен внутри довольно обширной гидрофобной полости.

Изменения конформации белковой глобулы в результате замораживания-отогрева можно оценить по спектрам поглощения глюкозооксидазы в УФ-области и спектрам флуоресценции ФАД, представляющего фактически активный центр фермента. При этом желательно исследовать первые производные спектров поглощения, которые позволяют значительно уменьшить влияние рассеяния белковых растворов и более информативны при изучении конформации белковой молекулы.

Проведенные исследования показали [13], что после замораживания и последующего отогрева наблюдается изменение структуры спектров поглощения глюкозооксидазы в УФ-области. На рис. 8 приведены первые производные спектров поглощения ГОД, из которых видно, что после быстрого замораживания минимум

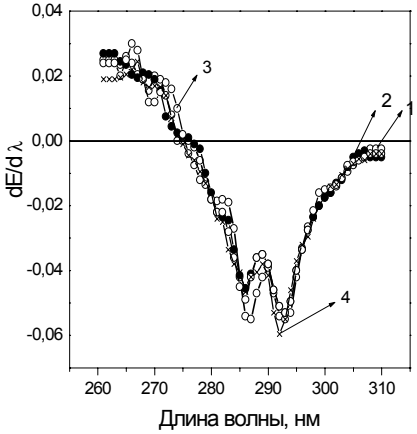


Рис. 8. Первые производные спектров поглощения ГОД в УФ-области (концентрация белка 0,25 мг/мл): 1 – контроль; 2 – однократное быстрое замораживание; 3 – пятикратное быстрое замораживание; 4 – медленное замораживание.

с длиной волны при 287 нм смещается в коротковолновую область и наблюдаются изменения в области 275–285 нм, что, вероятнее всего, связано с увеличением доступности растворителю областей белка, в которых расположены тирозиновые остатки.

После медленного замораживания и отогрева ГОД на первых производных спектров поглощения отмечается, кроме уже описанных изменений, смещение в коротковолновую область и минимума при 294 нм, который обусловлен остатками триптофана белка. Анализ представленных результатов свидетельствует о том, что после действия низких температур увеличивается доступность растворителю полярных остатков глюкозооксидазы.

Интенсивность флуоресценции флавина глюкозооксидазы (рис. 9), находящегося в глубоком гидрофобном кармане, уменьшается после замораживания и последующего отогрева фермента.

Наблюдаемое в описанных экспериментах тушение флуоресценции флавина, исходя из данных Zhong D. [43], свидетельствует об изменении конформации в области активного центра фермента. Основными взаимодействиями молекулы ФАД, обладающей подвижной конфигурацией, в гидрофобном кармане ГОД являются 23 потенциальные водородные связи, включая, главным образом, группы пирофосфата и рибозы. В тесном контакте с изоаллоксановым кольцом находятся четыре ароматических остатка Tyr-515, Trp-426, Tyr-68, и Trp-111. Наблюдаемое тушение флуоресценции

молекулы ФАД и происходит из-за ее взаимодействия с этими остатками.

Вероятно, после замораживания и последующего отогрева ГОД тушение флуоресценции флавина происходит в результате усиления взаимодействия между гидрофобными ароматическими остатками полипептидных цепей белка и молекулой кофермента как после быстрого, так и после медленного охлаждения, причем влияние медленного замораживания выражено в большей степени.

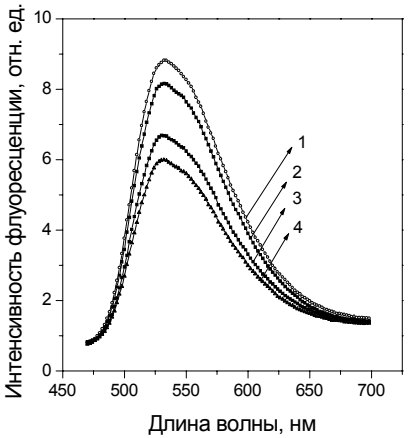


Рис. 9. Спектры флуоресценции ГОД (возбуждение на 450 нм, концентрация белка 0,25 мг/мл): 1 – контроль; 2 – однократное быстрое замораживание; 3 – пятикратное быстрое замораживание; 4 – медленное замораживание.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что замораживание и последующий отогрев ГОД нарушают внутримолекулярные взаимодействия фермента, что вызывает изменение конформации глюкозооксидазы – разрыхление поверхностных полипептидных цепей молекулы белка, наряду с которым трансформируется конформация вблизи активного центра фермента, приводящее к увеличению степени гидрофобности в этой области и изменению доступности молекул растворителя даже в область активного центра фермента.

Исследование ферментативной активности ГОД показало, что как быстрое, так и медленное замораживание приводят к ингибированию работы фермента. Так, после замораживания при охлаждении фермента до –196°С со скоростью 1 град/мин активность ГОД после отогрева составляла (72 ± 3)% по сравнению с контролем, в то время как после использования скорости охлаждения 100 град/мин ее активность была не ниже (80 ± 3)%.

Величина нарушений конформации и активности ГОД зависит от скорости замораживания. Значительные изменения наблюдаются после медленного замораживания фермента.

Известно, что одним из способов предотвращения повреждений биоструктур при замораживании является использование криопротекторов [1, 8]. Но криозащитные агенты могут быть не совсем индифферентными по отношению к целому ряду биологических объектов, в том числе и к белкам. Ввиду отсутствия обоснованной единой теории криоповреждения и криозащиты необходима экспериментальная оценка влияния криозащитных агентов на биомакромолекулы и надмолекулярные комплексы.

Таким образом, чтобы определить возможность улучшения сохранности ГОД при замораживании в присутствии криопротекторов, необходимо, прежде всего, оценить влияние самих криозащитных веществ на фермент. Исследование дифференциальных спектров поглощения флавина глюкозооксидазы в видимой области в растворах криопротекторов показало, что в присутствии 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и глицерина они имеют сходную структуру (рис. 10) и совпадают с данными литературы для протеинсвязанных флавинов [36].

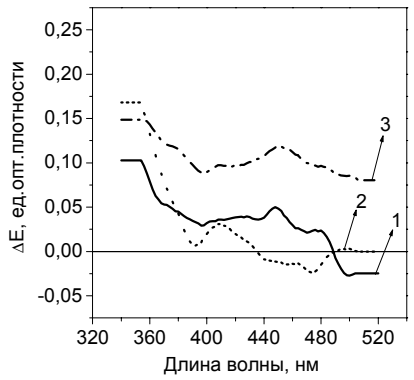


Рис. 10. Дифференциальные спектры поглощения ГОД в растворах криопротекторов: 1 – 60% глицерина; 2 – 60% ДМСО; 3 – 60% 1,2-ПД.

Меньшая интенсивность дифференциальных спектров в растворах глицерина может быть обусловлена большей степенью доступности хромофорных групп белка растворителю в этом случае по сравнению с растворами 1,2-ПД [29]. В глюкозооксидазе, как и во многих других белках, обнаружены «складки» или «щели» на поверхности молекул, в которые проникают пертурбанты с большим сродством и не проникают – с малым [32].

Можно отметить существенное отличие дифференциальных спектров поглощения флавина в среде, содержащей ДМСО.

Исследование спектров флуоресценции флавина ГОД в растворах глицерина и 1,2-ПД (возбуждение на 450 нм) показало, что они характеризуются меньшей интенсивностью (рис. 11) по сравнению со спектрами белка в буферном растворе, причем действие глицерина проявляется в большей степени. Это свидетельствует о том, что присутствие криопротекторов в растворе белка влияет на внутримолекулярные взаимодействия в макромолекуле и на его нативную конформацию, а также увеличивает гидрофобность в области расположения флавина фермента.

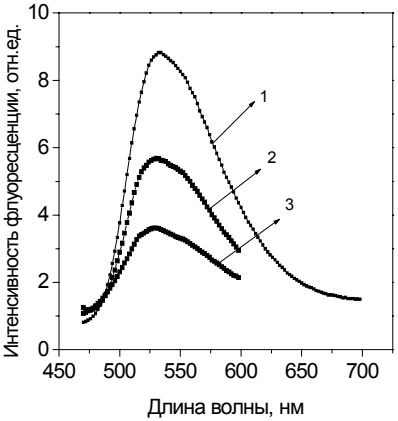


Рис. 11. Спектры флуоресценции ГОД в растворах криопротекторов: 1 – контроль; 2 – 1,2-ПД; 3 – глицерин.

Замораживание глюкозооксидазы в присутствии криопротекторов приводит к изменению спектров поглощения в УФ-области (рис. 12).

Изучение вида первых производных спектров поглощения показало смещение спектра как в области максимума, так и в областях, характеризующих поглощение триптофановых и тирозиновых остатков. Это можно, по-видимому, интерпретировать как изменение доступности белковых хромофоров для молекул растворителя в результате нарушения внутримолекулярных взаимодействий в макромолекуле и изменения ее конформации. Видимо, даже большие концентрации криопротекторов при замораживании-отогреве не предохраняют от изменений конформацию ГОД.

Изучение ферментативной активности ГОД в растворах криопротекторов показало, что сама экспозиция в растворах криозащитных веществ не оказывает существенного влияния на активность

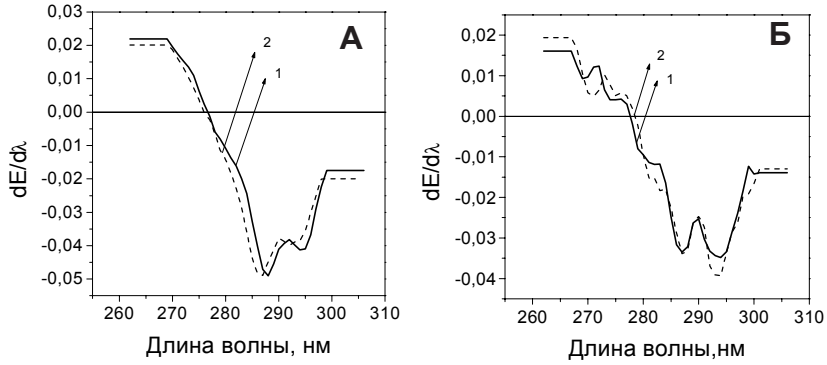


Рис. 12. Первые производные спектров поглощения ГОД в УФ-области в растворах 60% глицерина (А) и 60% 1,2-ПД (Б): 1 – контроль; 2 – после замораживания-отогрева (скорость охлаждения 7 град/мин).

фермента. В то же время присутствие криопротекторов в растворах фермента уменьшает ингибирование его активности в результате замораживания и последующего отогрева (рис. 13).

Таким образом, в присутствии криопротекторов в растворах ГОД изменяются внутримолекулярные взаимодействия в макромолекуле, его нативная конформация и увеличивается гидрофобность в области расположения флавина фермента. Но, несмотря на такие конформационные изменения, вызываемые криопротекторами, их присутствие в растворе не только не ингибирует активность фермента, но и предотвращает падение активности после замораживания-отогрева.

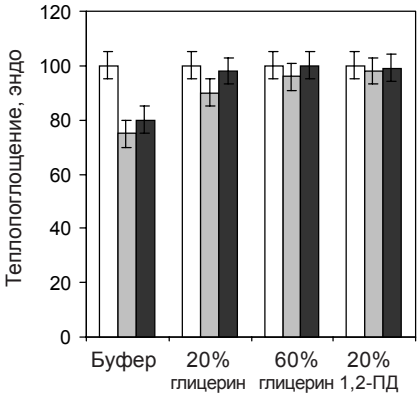


Рис. 13. Влияние замораживания-отогрева и криопротекторов на ферментативную активность ГОД.

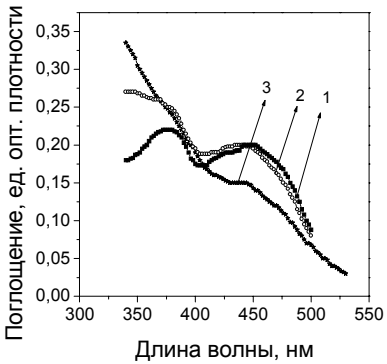


Рис. 14. Спектры поглощения ГОД: 1 – белок в растворе; 2 – иммобилизованная ГОД с глютаровым альдегидом; 3 – иммобилизованная ГОД с глютаровым альдегидом и САБ.

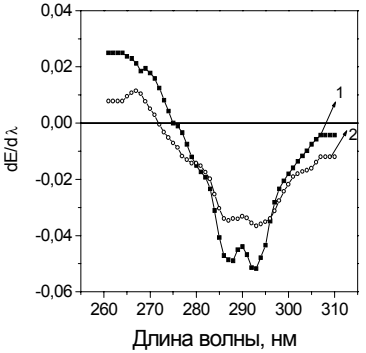


Рис. 15. Первые производные спектров поглощения ГОД: 1 – контроль; 2 – иммобилизованная ГОД.

Для эффективной работы биосенсора на основе ГОД последняя должна находиться в иммобилизованном состоянии на поверхности трансдьюсера. Связывание ГОД в виде сополимеризации осуществляется с помощью глютарового альдегида, который часто используется для иммобилизации белков, в том числе и на поверхность трансдьюсеров биосенсоров, что приводит к изменениям ее конформации. В случае сополимеризации фермента глютаровым альдегидом в присутствии САБ спектры поглощения активного центра изменяются в еще большей степени, чем без него (рис. 14).

Изменения спектров поглощения ГОД в ближней ультрафиолетовой области спектра, происходящие в результате ее сополимеризации с помощью глютарового альдегида, свидетельствуют о нарушениях внутримолекулярных взаимодействий в полипептидной цепи макромолекулы, проявляющихся в разрыхлении молекулы – сдвиг максимума спектра поглощения в коротковолновую область (рис. 15). Этот процесс связан с увеличением доступности к водному окружению хромофорных групп белка – среде с более низким значением показателя преломления [14]. В литературе описаны подобные результаты, полученные при иммобилизации ГОД путем сорбции [30].

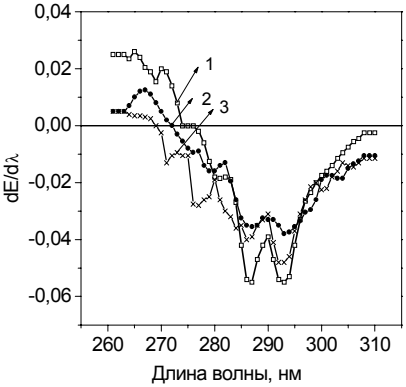


Рис. 16. Производные спектров поглощения сополимеризованной ГОД: 1 – контроль; 2 – охлаждение со средними скоростями 80–100 град/мин; 3 – охлаждение со скоростями от 1 до 7 град/мин.

Замораживание-отогрев сополимеризованной ГОД приводит к дополнительным изменениям конформации белка [25] по сравнению с наблюдаемыми в изолированном ферменте после быстрого замораживания (рис. 16). Судя по изменениям, наблюдаемым в первых производных спектров поглощения, отличия в области поглощения тирозиновых остатков более выражены, чем в изолированном ферменте, однако в области поглощения триптофановых остатков значительных изменений не отмечается.

Исследования показали, что и первые производные спектров поглощения флавина после замораживания-отогрева фермента не претерпевают значительных изменений (рис. 17). Это свидетельствует о том, что основным конформационным изменениям подвержена только полипептидная часть ферментного комплекса.

Наблюдаемые изменения конформации сополимеризованной ГОД сопровождаются увеличением ферментативной активности на 20%. Использование в таких системах криопротекторов вызывает однотипные изменения первых производных спектров поглощения флавина после замораживания-отогрева, свидетельствующие о том, что в полной мере предотвратить изменения конформации, вызванные замораживанием, не удается (рис. 17).

Изучение влияния замораживания и последующего отогрева в растворах криопротекторов на активность сополимеризованной ГОД показало, что при умеренных скоростях замораживания (20–35 град/мин) как глицерин, так и 1,2-ПД позволяют уменьшить ингибирование ферментативной активности уже при концентрации 20% (табл. 1).

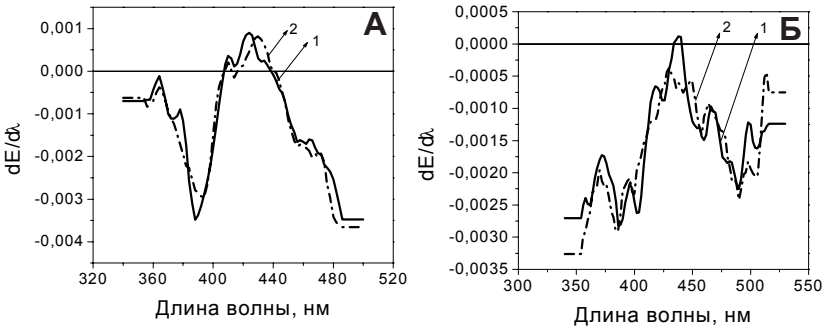


Рис.17. Первые производные спектров поглощения сополимеризованной ГОД: А – буферный раствор; Б – 20% 1,2-ПД (1 – контроль; 2 – охлаждение со средними скоростями 80–100 град/мин).

Замораживание и последующий отогрев глюкозооксидазы, сополимеризованной с помощью глютарового альдегида и САБ, значительно увеличивают активность фермента. Применение при замораживании этой системы высоких концентраций криопротекторов позволяет уменьшить активность фермента до уровня, наблюдаемого при замораживании сополимеризованой ГОД при отсутствии САБ (табл. 1).

Результаты исследования сополимеризованного фермента указывают на то, что процесс сополимеризации лабилизирует поверхность белковой глобулы по отношению к действию замораживания, однако гидрофобные области при этом более стабильны, т. е. нарушение внутримолекулярных взаимодействий касается только поверхностных полипептидных цепей. Замораживание фермента, конформация которого изменилась в процессе сополимеризации, приводит, по-видимому, к значительному увеличению доступности флавинадениндинуклеотида субстрату, вызывая усиление активности. Использование криопротекторов не всегда позволяет предотвратить эти изменения.

Интенсивная работа по созданию, разработке и внедрению биосенсоров требует современных методов их долгосрочного хранения. Проводимые экспериментальные исследования позволяют выявить некоторые особенности сохранности биологических дат-

Таблица 1. Активность сополимеризованной ГОД после замораживания-отогрева в растворах криопротекторов

Криопротектор	Концентрация криопротектора, %	Активность, % от контроля	
		ГОД + глютаровый альдегид	ГОД + глютаровый альдегид + САБ
-	-	118 ± 6	200 ± 8
1,2-ПД	20	105 ± 5	176 ± 10
1,2-ПД	60	104 ± 5	120 ± 7
Глицерин	20	96 ± 6	144 ± 8
Глицерин	60	98 ± 5	118 ± 6

чиков в основном при температурах, близких к комнатной, и температуре бытового холодильника [35], хотя имеются сообщения о попытках использования более низких температур и некоторых криозащитных веществ [38, 42]. Увеличение сроков хранения биосенсоров возможно при внедрении технологий низкотемпературного консервирования при температурах кипения сжиженного азота или даже гелия. Прежде всего, низкие температуры необходимы для длительного хранения биологического преобразователя биосенсоров, который даже при гипотермических температурах не может долго сохранять свою функциональную активность. Полученные в результате описанных выше исследований данные позволяют обоснованно применять определенные режимы замораживания и криопротекторы для обеспечения высокого уровня сохранности фермента после замораживания и хранения при низких температурах. Но при замораживании устройства, в котором биологический объект является его составной частью, важно учитывать и влияние замораживания на другие его составляющие. Физико-химический преобразователь миниатюрных электрохимических биосенсоров представляет собой сложную конструкцию и состоит,

как минимум из трех элементов – диэлектрической подложки, металлических электродов с токопроводящими путями и изолирующей оболочки, которые изготовлены из разных материалов, а значит имеют разные коэффициенты линейного и объемного расширения. Это может привести к тому, что после замораживания-отогрева с большими градиентами температуры произойдут расслаивание на границе разных материалов, нарушение их целостности или полная деструкция трансдьюсера. Потому определение влияния режимов замораживания на защитный слой, поверхность и гребенчатые электроды преобразователя весьма актуально [12, 13].

Исследования показали, что при замораживании возможно нарушение структуры трансдьюсеров. При быстром замораживании происходило растрескивание защитного слоя из эпоксидного лака и эпоксидного клея, а фоторезист покрывался небольшими трещинами (рис. 18).

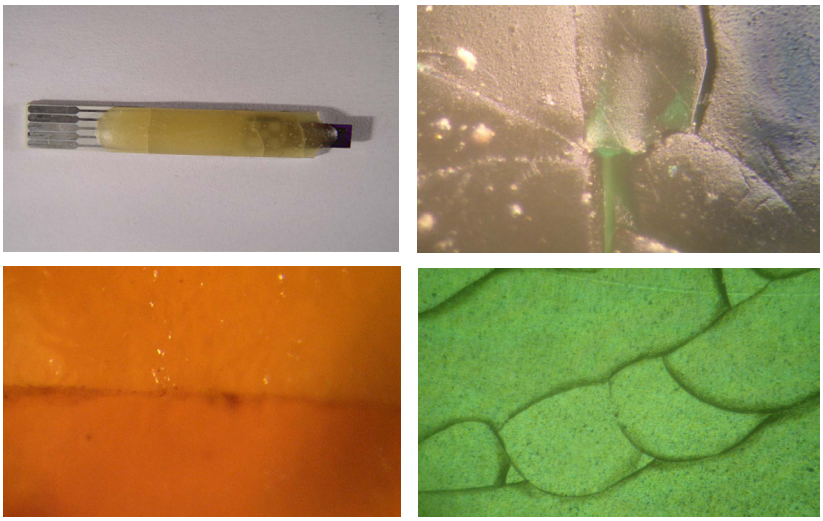


Рис. 18. Растрескивание защитных слоев трансдьюсеров после быстрого охлаждения и отогрева, ×100.

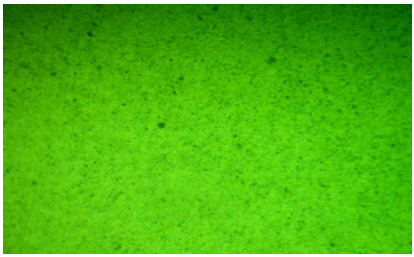


Рис. 19. Сохранение защитного слоя из эпоксидного лака, обработанного 25%-м раствором глицерина, после быстрого охлаждения и отогрева, ×100.

Интересно, что в результате использования традиционных криозащитных растворов улучшалась сохранность электрохимических преобразователей при охлаждении, что объясняется, по-видимому, уменьшением градиента температуры. При обработке 25%-м раствором глицерина защитных слоев, наиболее чувствительных к быстрому замораживанию преобразователей, заметного растрескивания защитного слоя из эпоксидного лака не происходило (рис. 19).

Таким образом, были определены оптимальные скорости охлаждения и концентрации криопротекторов, обеспечивающие сохранность как ГОД, так и электрохимических преобразователей. Исследовано влияние низких температур и криопротекторов на модель биоселективного элемента биосенсоров – ГОД в иммобилизованном состоянии. Для долгосрочного хранения миниатюрных ферментных электрохимических биосенсоров [13] исследовали один из наиболее перспективных биосенсоров этого типа [34, 35, 40] – тонкопленочные кондуктометрические биосенсоры, изготовленные в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Как видно из табл. 2, охлаждение биосенсора на основе глюкозооксидазы со скоростью 300–400 град/мин без использования криопротекторов и последующий отогрев выводили его из строя. После использования охлаждения со средними скоростями 80–100 град/мин без криозащитных веществ величина отклика составляла около 23%. Для обеспечения защиты биосенсора при замораживании и последующем отогреве были использованы 60%-е растворы глицерина и 1,2-ПД.

Инкубация биосенсоров в растворах криопротекторов с последующим трехразовым отмыванием буфером на протяжении 30 мин незначительно уменьшает величину отклика биосенсора

Таблица 2. Влияние криопротекторов, скорости охлаждения и условий хранения на величину отклика биосенсоров

Исследуемые образцы	Отклик биосенсора, %
1. Контроль	100 ± 3
2. Биосенсор + 60%-й раствор глицерина	91 ± 5
3. Биосенсор + 60%-й раствор 1,2-ПД	95 ± 5
4. Охлаждение до –196°С со скоростью 300–400 град/мин без криопротекторов	0
5. Охлаждение до –196°С со скоростью 80–100 град/мин без криопротекторов	23 ± 4
6. Охлаждение до –196°С со скоростью 80–100 град/мин с 60%-м раствором глицерина	68 ± 7
7. Охлаждение до –196°С со скоростью 80–100 град/мин с 60%-м раствором 1,2-ПД	46 ± 7
8. Хранение в течение года при –196 °С с 60%-м раствором глицерина после охлаждения со скоростью 80–100 град/мин	65 ± 8
9. Хранение в течение года при –80°С с 60%-м раствором глицерина после охлаждения со скоростью 80–100 град/мин	75 ± 8
10. Хранение в течение года при –80°С с 60%-м раствором 1,2-ПД после охлаждения со скоростью 80–100 град/мин и отогрев	79 ± 8
11. Хранение в течение года при 4°С	0

(табл. 2). Замораживание биосенсоров в растворах криопротекторов улучшает их сохранность. Так, в случае использования 1,2-ПД и охлаждения со средними скоростями 80–100 град/мин величина отклика у биосенсоров больше в два раза, а при использовании глицерина – в три раза, чем при замораживании без крио-

протектора. У биосенсоров после хранения в течение года при 4°С отклик отсутствовал, а величина отклика биосенсоров, хранившихся при температуре сжиженного азота, была близка к величине отклика биосенсоров, подвергнутых замораживанию в присутствии криопротекторов (65 ± 8 и 68 ± 7 соответственно).

На основании результатов исследования влияния скоростей замораживания-отогрева, а также изменений состава среды и концентраций соответствующих криопротекторов на функциональную активность и конформационную стабильность сополимеризованной ГОД с глютаровым альдегидом было предложено использовать замораживание с растворами 1,2-ПД и глицерина для создания более экономичного способа долгосрочного хранения биосенсоров при –80°С. Проведенные исследования влияния этих условий на величину отклика иммобилизованной глюкозооксидазы в составе рабочего биосенсора показали, что биологический датчик в течение года сохраняет свои рабочие характеристики и стабильность работы при умеренно низкой температуре (–80°С) с величиной отклика 73 ± 7 при хранении в 60%-м растворе глицерина и 78 ± 7 – в 60%-м растворе 1,2-ПД.

Полученные экспериментальные данные позволили разработать способ хранения биосенсоров на основе ГОД на протяжении одного года без существенного влияния на величину их отклика [27].

Предложенные способы долгосрочного хранения ферментных биосенсоров дали возможность отработать технологический процесс хранения биосенсоров на основе ГОД, который позволяет быстро и удобно проводить операции по замораживанию, хранению и отогреву биосенсоров. На основе описанного технологического процесса были разработаны и изготовлены образцы контейнеров, холдер-кассеты, а также оборудование для замораживания биосенсоров по необходимым режимам. С учетом изготовленного оборудования создана технология долгосрочного хранения миниатюрных электрохимических биосенсоров на основе глюкозооксидазы.

Таким образом, при исследовании естественных белковых смесей (СКК, ФЖ, водно-солевые экстракты плаценты) и индивидуальных белков (ГОД) установлено, что при использовании небла-

гоприятных режимов замораживания (скорость охлаждения от 1 до 7 град/мин) наблюдаются разрыхление поверхностных полипептидных цепей и агрегация биомакромолекул. На основе анализа экспериментальных данных предложен механизм конформационно-структурных криоповреждений биомакромолекул. Снижение ферментативной активности ГОД после замораживания-отогрева вплоть до (72 ± 3)% зависит от скорости охлаждения и солевого состава среды, а также является результатом изменения конформации белка даже в области активного центра, приводящего к увеличению степени гидрофобности в этой области. Сополимеризация водорастворимой ГОД вызывает нарушение внутримолекулярных взаимодействий в белке, что приводит к стабилизации гидрофобных областей, разрыхлению поверхностных полипептидных цепей белка и увеличению лабилизации белковой поверхности к действию замораживания. Такие изменения конформации сополимеризованного белка при замораживании с низкими скоростями усиливают доступность ФАД субстрату и увеличивают активность.

Полученные данные свидетельствуют о том, что криопротекторы в растворах белка изменяют внутримолекулярные взаимодействия в макромолекулах. Показано, что при этом нарушается их нативная конформация, затрагивается и область активного центра, например, увеличивается гидрофобность окружения флавина ГОД. Несмотря на это, присутствие криопротекторов в растворе не только не ингибирует активность ферментов, но и предотвращает понижение активности после замораживания-отогрева. Так, охлаждение ГОД до –196°С со скоростью 100 град/мин и использование глицерина в концентрации до 25% позволили повысить уровень активности фермента до (89 ± 4)% по сравнению с (80 ± 3)% без глицерина.

Проведенные эксперименты позволили авторам обосновать выбор режимов замораживания и криопротекторов, при которых стабильная активность ГОД в составе биосенсора сохраняется в течение года при температуре хранения –196 или –80°С. Создана технология долгосрочного хранения миниатюрных электрохимических биосенсоров на основе ГОД.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев : Наук. думка, 1994. – 432 с.
2. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернер и др. – М.: Мир, 1992. – 615 с.
3. Брандс Дж. Конформационные переходы белков в воде и смешанных растворителях // Структура и стабильность макромолекул. – М., 1973. – С. 174–254.
4. Гаврилова И.И. Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно–конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1982. – 20 с.
5. Геродес А.Г., Горобченко О.А., Нардид О.А. и др. Биохимические и диэлектрические характеристики фолликулярной жидкости яичников человека после замораживания-отогрева // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №1. – С. 73–82.
6. Горобченко О.А., Маркова Н.Т., Нардид Э.О. и др. Влияние низких температур на сыворотку кордовой крови человека // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – Вип. 3. – С. 52–57.
7. Горобченко О.А., Мошко Ю.А., Николов О.Т. и др. Влияние режимов замораживания на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови // Проблемы криобиологии. – 2004. – №2. – С. 4–10.
8. Грищенко В.И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя нации // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 269–274.
9. 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.
10. 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.
11. Грищенко В.И., Нардид Э.О., Цымбал Л.В., Нардид О.А. Исследование влияния замораживания–отогрева на структурно–динамическое состояние компонентов сыворотки кордовой крови человека // Експериментальна і клінічна медицина. – 2006. – №4. – С. 12–17.
12. Грищенко В.І., Нардід О.А., Розанова К.Д. та ін. Дослідження впливу охолодження й гліцерину на фізичний перетворювач біосенсорів // Проблемы криобиологии. – 2003. – №3. – С. 71–74.
13. Грищенко В.І., Нардід О.А., Розанова К.Д. та ін. Низькотемпературна стабілізація глюкозооксидази в складі біологічного сенсора // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, №3. – С. 236–242.
14. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – К.: Наук. думка, 1981. – 208 с.
15. Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. – К.: Наук. думка, 2006. – 256 с.
16. Єльська Г.В., Корпан Я.І. Біосенсорні технології: реалії та перспективи // Вісник НАН України. – 2000. – №3. – С. 36–40.
17. Митькин В.В., Сухих Г.Т. Эндогенные опиоидные пептиды при беременности и родах // Акушерство и гинекология. – 1993. – №5. – С. 6–10.
18. 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.
19. Нардид О. А. Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов // Проблемы криобиологии. – 1999. – №3. – С. 31–34.

20. 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.
21. Нардид Э.О., Науменко Е.И., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Влияние режимов замораживания на агрегацию белков сыворотки кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. – 2006. –Т. 16, №3. – С. 311–315.
22. 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.
23. Насонов Е.Л., Виноградов В.А. Опиоидные пептиды как регуляторы системы иммунитета // Бюл. Всесоюз. кардиолог. науч. центра АМН России. – 1990. – Т. 10, №1. – С. 3–10.
24. 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.
25. Розанова Е.Д., Нардид О.А., Науменко Е.И. и др. Особенности влияния низких температур на сополимеризованную глюкозооксидазу : Тези доп. IV з'їзду Укр. біофіз. товариства, 19–21 грудня 2006 р. – Донецьк, 2006. – С. 317–318.
26. Розанова Е.Д., Науменко Е.И., Моисеев В.А. и др. Структурно-функциональные параметры цитохромоксидазы в растворе и в составе липосом: влияние глицерина // Проблемы криобиологии. – 1992. – №1. – С. 32–35.
27. Пат. 80485 Україна, МПК A 01 N 1/00, C 12 N 9/04. Спосіб зберігання біосенсорів на основі ферментів / Грищенко В.І., Нардід О.А., Розанова К.Д. та ін.: заявники і патентовласники Ін–т проблем кріобіології і кріомедицини НАН України та Ін–т молекулярної біології і генетики НАН України. – № U200512549 ; заявл. 26.12.05; опубл. 25.09.07, Бюл. №15.
28. Cao E., Chen Y., Cui Z. et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // J. Biotechnol. Bioenerg. – 2003. – Vol. 82, №6. – P. 684–690.
29. Donovan J.W. Ultraviolet absorption // Physical principles and techniques of protein chemistry. –New York, 1969. – P. 101–170.
30. Gidalevitz D., Huang Z., Rice S.A. Protein folding at the air-water interface studied with X-ray reflectivity // Proc. Natl. Acad. Sci USA. –1999. – Vol. 96, №6. – P. 2608–2611.
31. Gorobchenko O.A., Gerodes A.G., Nardid O.A., Nikolov O.T. Dielectric properties of human ovary follicular fluid at 9.2 GHz // Bioelectrochemistry. – 2010. – Vol. 79, №2. – P. 193–197.
32. Herskovits T.T., Sorensen S.M. Studies of the location of tyrosyl and tryptophyl residues in proteins. 1. Solvent perturbation data of model compounds // Biochemistry. – 1968. – Vol. 7, №7. – P.2523–2533.
33. Jordan G.M., Yoshioka S., Terao T. The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state // J.Pharm.Pharmacol. –1994. – Vol. 46, №3. – P.182–185.
34. Kell D.B., Davey C.L. Conductimetric and impediometric devices // Biosensors. A practical approach. – Oxford, 1990. – P. 125–153.
35. Korpan Y.I., Dzyadevich S.V., Zharova V.P. et al. Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // Укр. биохим. журнал. – 1994. – Т. 66, №1. – С. 78–82.
36. Muller F., Mayhew S.G., Massey V. On the effect of temperature on the absorption spectra of free and protein-bound flavines // Biochemistry. – 1973. – Vol. 12, №23. – P. 4654–4662.

37. Nardid O.A., Dyubko T.S., Rozanova E.D. et al. A study of structural and functional state modification of certain proteins when exposed to low temperatures // CryoLetters. – 1999. – Vol. 20, №5. – P. 283–286.
38. Nistor C., Emneus J., Gorton L. et al. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based grafite electrodes for detection of phenolic compounds // Anal. Chem. Acta. – 1999. – Vol. 387. – P. 309–326.
39. Sarciaux J. M., Mansour S., Hageman M. J. et al. Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine Ig G during freeze-drying // J. Pharm. Sci. – 1999. – Vol. 88, №12. – P. 1354–1361.
40. Starodub N.F., Rebriev A.V. Liquid photopolymerizable compositions as immobilized matrix of biosensors // Bioelectrochemistry. – 2007. – Vol. 71, №1. – P. 29–32.
41. 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.
42. Yagar H., Sagiroglu A. Non-covalent immobilization of quince (Cydonia ollonga) polyphenol oxidaze on alumina // Acta Chim. Slov. – 2002. – Vol. 49. – P. 893–902.
43. Zhong D., Zewail A. H. Femtosecond dynamics of flavoproteins: Charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, №21. – P. 11867–11872.
44. Zhongshui Y. U., Garcia A. S., Jonston K. P. et al. Spray freezing into liquid nitrogen for highly stable protein nanostructures microparticles // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2004. – Vol. 58, №3. – P. 529–537.

Синтез, физико-химические и криозащитные свойства оксиэтильных производных спиртов

А.М. Компаниец*, В.В. Чеканова, А.В. Николенко, А.В. Зинченко, Ю.С. Пахомова

Отдел криопротекторов
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: a.m.kompaniets@gmail.com*

Изучение защитного действия криопротекторов относится к важным задачам криобиологии. С момента открытия криопротекторов фактически началось стремительное развитие криобиологических исследований.

Изучению криопротекторов посвящено множество публикаций, содержащих глубокие фундаментальные исследования механизмов их криозащитного действия, описание химических, физико-химических, биологических, токсико-фармакологических и криозащитных свойств. Со второй половины XX столетия методы криоконсервирования и долгосрочного хранения клеток и тканей при низких температурах нашли широкое применение во многих областях медицины, биологии, сельского хозяйства. Однако в настоящее время в практике низкотемпературного консервирования используется не более 10–15 соединений. Остаются открытыми многие вопросы, касающиеся механизма их криопротекторного действия, важной и сложной проблемой является токсичность криопротекторных веществ [2, 19, 28, 29, 35].

Исследования в области низкотемпературного консервирования клеток крови и костного мозга, создания и изучения химических

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 73–100.
© А.М. Компаниец, В.В. Чеканова, А.В. Николенко и др., 2012

Используемые сокращения
$ОЭГ_{n = x}$ – оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации *x*
$ОЭМЦ_{n = 35–35}$ – оксиэтилированный метилцеллозольв со степенью полимеризации 33–35
МЦ – метилцеллозольв
ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс

соединений, обладающих криопротекторными свойствами, были начаты в г. Харькове (Украина) в конце 50-х годов. Так, в Харьковском институте переливания крови разрабатывались методы долгосрочного хранения клеток крови (М.И. Шраго, А.А. Шинкаренко); в Харьковском фармацевтическом институте (М.Х. Глузман, В.И. Дашевская) был осуществлен синтез химических веществ – полиэтиленоксидов. Исследование полиэтиленоксидов в Физико-техническом институте низких температур НАН Украины (Б.И. Веркин, Н.С. Пушкарь, М.И. Шраго, А.М. Воротилин, В.Г. Манжелий) показало, что они обладают криопротекторными свойствами и эффективны при низкотемпературном консервировании клеток костного мозга и эритроцитов человека.

С 1972 года изучение криопротекторных соединений осуществляется в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, в отделе криопротекторов, который возглавляла М.И. Шраго, а затем – В.И. Луговой.

М. И. Шраго – основоположник научной школы и направления в криобиологии, посвященного системному изучению криопротекторов, установлению зависимости криопротекторных свойств и токсичности веществ от их химической структуры и физико-химических свойств в гомологичных рядах химических соединений (полиолы, амиды и их производные, продукты направленного синтеза) [24, 25]. Важным направлением работы отдела явилась реализация идеи создания новых эффективных криопротекторов, обладающих не только высокой криозащитной активностью, но и низкой токсичностью для клеток, тканей и целого организма. С этой целью разработан и использовался экспериментальный подход (М.И. Шраго, Л.А. Ханина), заключающийся в химической модификации молекул классических криопротекторов (этиленгли-

коль, глицерин, ацетамид и др.) включением в их молекулу заместителей различной природы (C_2H_5, CH_3, $OCH_2–CH_2$), подборе надлежащих условий синтеза. Такой подход позволил создать новые химические соединения, варьировать степень их полимеризации и структуру [25, 27].

Одним из способов получения новых оригинальных криопротекторов явилось оксиэтилирование различных мономеров – глицерина, этиленгликоля, амидов, пентаэритрита [16]. Оксиэтилирование позволило изменять биологические свойства и механизм криозащиты: полученные олигомеры утрачивали способность проникать в клетки и, в отличие от исходного вещества, приобретали свойства криопротекторов экзоцеллюлярного действия.

Так, в результате направленной модификации молекулы трехатомного спирта глицерина ($C_3H_8O_3$) путем присоединения оксиэтильных звеньев ($–CH_2–CH_2–O–$) впервые были синтезированы новые вещества – оксиэтильные производные глицерина со степенью полимеризации от n = 1 до n = 50 ($ОЭГ_{n=1–50}$) (молекулярные массы от 130 до 2300) [17]. Скрининг их криопротекторных свойств показал, что олигомеры ОЭГ со степенью полимеризации n = 20–30 ($ОЭГ_{n=20–30}$) проявляют защитное действие при замораживании эритроцитов, а $ОЭГ_{n=5}$ и $ОЭГ_{n=10}$ – при замораживании тромбоцитов и ядросодержащих клеток крови, а также изолированных лизосом [18, 20]. Полимергомолог ОЭГ со степенью полимеризации n = 3 ($ОЭГ_{n=3}$) оказался эффективным криопротектором при низкотемпературном консервировании 2-суточной культуры перевиваемой почки овцы [26]. При замораживании спермиев человека [21] отмечена длительная их переживаемость после замораживания-отогрева в криозащитных растворах, содержащих $ОЭГ_{n=2}$ и $ОЭГ_{n=3}$. Полученные данные свидетельствовали о высокой криопротекторной активности полимергомологов ОЭГ при замораживании различных биологических объектов.

Установлено, что все изученные полимергомологи ОЭГ являются малотоксичными веществами [24]. Однако, несмотря на перспективность практического применения оксиэтильных производных глицерина, комплексное исследование их криопротекторных свойств получило развитие лишь в последние годы.

Выбор оптимальных условий синтеза оксиэтильных производных полиолов

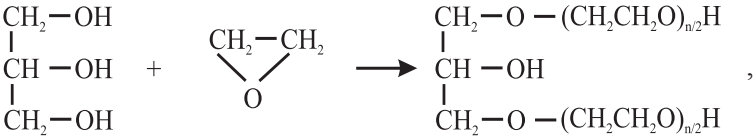
Синтез оксиэтильных производных веществ, относящихся к различным классам химических соединений (спирты, амиды, амины и т. д.), осуществляется путем присоединения окиси этилена к молекуле исходного вещества в результате реакции цепной полимеризации в присутствии катализаторов различной природы.

Известно [23], что механизм взаимодействия спиртов с окисью этилена является сложным химическим процессом, который определяется многими факторами: температурой проведения реакции, природой исходного соединения, степенью его оксиэтилирования, полярностью среды.

Синтез ОЭГ осуществляли путем присоединения окиси этилена к молекуле глицерина в присутствии щелочных и кислых катализаторов – таким образом происходит постепенное наращивание полимерной цепи до полного израсходования окиси этилена.

Процесс оксиэтилирования глицерина осложнен тем, что в его составе находятся гидроксильные группы различной природы: две первичные и одна вторичная. Анализ проведенных исследований показал, что криопротекторная активность и токсичность оксиэтильных производных глицерина определяются не только природой функциональной группы, длиной оксиэтильной цепи, но и местом присоединения полиоксиэтиленовой цепи – по первичной либо вторичной гидроксильной группе молекулы глицерина. Химическая структура конечных продуктов синтеза оксиэтилированного глицерина определяется характером применяемого катализатора.

Вначале с целью разработки оптимальных условий синтеза олигомеров ОЭГ в лабораторных условиях было проведено оксиэтилирование глицерина с использованием различных катализаторов – кислых (эфират BF_3, кислоты Льюиса) и щелочных (KOH, LiOH, NaOH), что позволило получить продукты с различной структурой. Изучение синтезированных олигомеров показало, что криопротекторными свойствами обладают только продукты присоединения оксида этилена к молекуле глицерина по первичным группам (положения 1,3) с применением щелочного катализатора:



где n – степень полимеризации.

К таким производным относятся оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации n = 5, 25, 30 ($ОЭГ_{n=5}$, $ОЭГ_{n=25}$, $ОЭГ_{n=30}$). Наличие же в смеси изомеров продуктов присоединения по вторичному радикалу, полученных в присутствии эфирата BF_3 либо кислот Льюиса, увеличивает цитотоксичность синтезированных соединений и их общую токсичность для организма.

К такому же заключению мы пришли, исследуя оксиалкилированные производные 1,2-пропандиола (CH_3–CHOH–CH_2OH). Этоксилаты 1,2-пропандиола, полученные на катализаторе кислой природы, оказались токсичнее исходного соединения, а также продукта, синтезированного в присутствии щелочного катализатора. Токсичность этоксилатов данной структуры проявлялась в их повреждающем действии на клетки костного мозга крыс и эритроциты человека в период непродолжительной экспозиции с клеточными суспензиями.

Таким образом, перспективными в плане реализации криопротекторных свойств оказались лишь оксиэтильные производные глицерина, содержащие заместители по первичным гидроксильным группам. Оптимальными условиями синтеза ОЭГ является присоединение окиси этилена к первичным гидроксильным группам молекулы глицерина в присутствии щелочных катализаторов (КОН, LiOH, NaOH) в результате реакции полимеризации.

С учетом отработанных оптимальных условий синтеза ОЭГ был синтезирован оксиэтилированный метилцеллозольв со степенью полимеризации n = 33–35 ($ОЭМЦ_{n=33–35}$) [27]: $CH_3O(CH_2CH_2O)_nH$, где n = 33–35.

Синтез ОЭГ и ОЭМЦ по разработанному в нашем отделе методу апробирован и осуществляется с 2003 года на химическом предприятии «Барва» (г. Ивано-Франковск).

Очистка и идентификация оксиэтилированных соединений

Очистка синтезированных оксиэтилированных соединений проводится в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины по специально разработанной технологии.

Оксиэтильные производные полиолов идентифицируют с помощью методов протонно-магнитного резонанса (ПМР) и ИК-спектроскопии.

Так, в соответствии с ПМР-спектрами $ОЭГ_{n=5}$, $ОЭГ_{n=25}$, $ОЭГ_{n=30}$ и $ОЭМЦ_{n=33–35}$ протоны этокси-групп неэквивалентны из-за различного окружения и проявляются в виде квадруплета в полях с $\delta = 3{,}50–4{,}30$ м. д. Протоны ОН-групп меньше экранированы, и их сигналы находятся в поле с $\delta = 2{,}90–3{,}40$ м. д. На спектре ПМР для ОЭМЦ дополнительно обнаруживается сигнал метильной группы в сильном поле с $\delta = 1{,}60$ м. д.

Структура синтезированных соединений подтверждается соответствующей частотой валентных колебаний ОН–, $ОСН_2СН_2$– и С–С (υ, $см^{-1}$) групп, определяемых с помощью ИК-спектроскопии. Для оксиэтилированных глицеринов характерна полоса поглощения ОН-групп в области 3400 $см^{-1}$. Появление этой полосы обусловлено межмолекулярными водородными связями. Для оксиэтилированных глицеринов свойственно также наличие полосы поглощения в области 2920–2860 $см^{-1}$, что соответствует валентным колебаниям оксиэтильных групп. Характерная частота валентных колебаний для υ(С–О) имеет значение 1050–1150 $см^{-1}$, а для структур, имеющих группу $СН_2ОН$, – в виде четкой полосы в спектре при 1050 см-1. Незначительное удлинение оксиэтильного звена вызывает смещение полосы до 1100 $см^{-1}$. Валентные колебания группы $СН_2$–$СН_2$ попадают в интервал 1050–1150 $см^{-1}$. Полоса валентных колебаний $СН_3$-группы регистрируется в области 1620 $см^{-1}$. Таким образом, с помощью ИК-спектров оксиэтилированных производных полиолов можно получить почти полную картину характеристического поглощения групп, которые определяют структуру данных веществ.

Молекулярно-массовое распределение и фракционный состав этоксилатов глицерина исследовали методами газовой и жид-

костной хроматографии. Вследствие неоднородности продуктов оксиэтилирования, в частности из-за возможного образования изомеров, расшифровать их состав достаточно трудно. Для идентификации состава этоксилатов глицерина были синтезированы индивидуальные олигоэфиры глицерина: 1-моноэтоксиглицерин; 1,3-диэтоксиглицерин; 1,1-диэтоксиглицерин. Проведенные исследования показали, что олигоэфир с 3 оксиэтильными звеньями является почти индивидуальным соединением, а олигоэфиры с 4 или 5 оксиэтильными звеньями – полидисперсными соединениями, содержащими достаточно широкий набор полигомергомологов со степенью полимеризации от n = 2 до n = 11.

Исследование молекулярно-массового распределения $ОЭГ_{n=5}$ показало, что синтезированный полимер является полидисперсным соединением, содержащим смесь полимергомологов различной молекулярной массы (табл. 1). Наиболее высокое содержание этоксилатов глицерина (39,0%) соответствует степени полимеризации n = 4–5.

Хроматографический анализ молекулярно-массового распределения $ОЭГ_{n=30}$ показал, что содержание высокомолекулярных фракций олигомеров глицерина с n = 28–30 составило 61% (содержание фракции n = 30–40%), в оставшиеся 39% входят полимергомологи с меньшей и большей степенью полимеризации.

Таблица 1. Молекулярно-массовое распределение $ОЭГ_{n=5}$

Степень полимеризации, n	Молекулярная масса	Содержание, %
1	6	2
2	20	7
3	45	14,5
4	59	19,0
5	64	20,0
6	48	15,5
7	33	10,5
8	19	6
9	9	3
10	5	1,5
11	3	1,0

Физико-химические свойства оксиэтильных производных полиолов

Модификация структуры глицерина и метилцеллозольва (МЦ) методом оксиэтилирования приводит к изменению их физико-химических свойств. Степень этих изменений зависит от химической структуры синтезированных соединений, числа введенных в молекулу гидрофильных групп.

Исследование динамической вязкости водных растворов $ОЭГ_{n=5}$, $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ показало, что у олигомеров этого ряда данный показатель зависит от молекулярной массы, и с увеличением степени полимеризации возрастает. Так, если показатель вязкости 10%-го раствора глицерина составляет $1{,}235\times10^{-3}$ Па·с, то для 10%-х растворов $ОЭГ_{n=5}$, $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ этот показатель увеличивается до значений $1{,}322\times10^{-3}$, $1{,}522\times10^{-3}$ и $1{,}801\times10^{-3}$ Па·с соответственно (табл. 2). Увеличение показателя вязкости для растворов ОЭГ характеризует лучшую их способность к взаимодействию с водой за счет образования водородных связей. Кроме того, увеличение вязкости может способствовать снижению скорости физико-химических процессов в клеточных суспензиях при криоконсервировании за счет замедления водных диффузионных процессов в присутствии ОЭГ.

Таблица 2. Физико-химические свойства 10%-х (м/м) растворов глицерина, МЦ и их оксиэтильных производных

Вещество	Плотность, г/см³	Вязкость, $\times10^{-3}$ Па·с	Поверхностное натяжение, эрг/см²	Температура замерзания, °С	Коэффициент распределения
Глицерин	1,023	1,235	71,790	–2,15	0
$ОЭГ_{n=5}$	1,017	1,322	69,991	–0,65	0,03
$ОЭГ_{n=25}$	1,014	1,522	67,307	–0,15	0,01
$ОЭГ_{n=30}$	1,015	1,801	63,674	–0,10	0
МЦ	1,002	1,334	63,464	–2,55	0,121

С увеличением концентрации ОЭГ показатель вязкости также возрастает. Так, динамическая вязкость 15, 20 и 30%-х растворов $ОЭГ_{n=25}$ повышается до $3{,}101\times10^{-3}$, $4{,}10\times10^{-3}$ и $6{,}798\times10^{-3}$ Па·с соответственно, тогда как для 40%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$ отмечено её резкое увеличение до $10{,}079\times10^{-3}$ Па·с. Такое аномальное увеличение вязкости растворов полимеров может быть связано с особенностями строения макромолекул и образованием различных структур в растворе при увеличении концентрации полимера. Находящиеся в растворе клубки макромолекул всегда удерживают внутри себя некоторое количество растворителя (вода), что может приводить к увеличению их размеров и, следовательно, возрастанию вязкости [12, 23]. Поверхностная активность растворов $ОЭГ_{n=25}$ с повышением концентрации вещества в растворе снижается, что может свидетельствовать об увеличении адсорбции криопротектора на границе раздела фаз.

Известно, что важным свойством криопротекторов является характер их взаимодействия с поверхностью клеточной мембраны [18]. Предполагают, что увеличение прочности мембраны клеток под действием непроникающего криопротектора осуществляется за счет образования сольватной оболочки вокруг белковых макромолекул, уменьшения микровязкости липидного бислоя [19].

Коэффициент распределения криопротекторов в бинарной системе вода-н-октанол характеризует способность молекул криопротектора взаимодействовать с неполярными компонентами мембран. Анализ значений коэффициента распределения ОЭГ свидетельствует о том, что оксиэтилированные соединения имеют большее сродство к воде, чем к органическому растворителю. Этот факт указывает на незначительную способность исследованных соединений к взаимодействию с неполярными компонентами мембран [23].

Показатели плотности и поверхностного натяжения водных растворов синтезированных олигомеров несколько снижаются с увеличением степени полимеризации: если поверхностное натяжение глицерина равно 71,79 эрг/см^2, то введение 5 звеньев окиси этилена снижает показатель поверхностного натяжения до 69,99 эрг/см^2, 25 звеньев – 67,30 эрг/см^2, а 30 звеньев – 63,67 эрг/см^2.

Температура замерзания олигомеров ОЭГ с увеличением степени полимеризации и, соответственно, гидрофильности оксиэтильных производных повышается. Если у 10%-го раствора глицерина температура замерзания соответствует значению –2,15°С, то у 10%-го раствора $ОЭГ_{n = 30}$ температура замерзания равна –0,10°С.

Показатели плотности, вязкости, поверхностного натяжения 10%-х растворов $ОЭМЦ_{n = 33–35}$ увеличиваются по сравнению с исходным веществом – МЦ (табл. 2). Более высокий показатель вязкости 10%-го раствора $ОЭМЦ_{n = 33–35}$ свидетельствует о лучшей способности этого соединения к взаимодействию с водой по сравнению с МЦ [12], тогда как поверхностное натяжение раствора $ОЭМЦ_{n = 33–35}$ изменяется незначительно и составляет 64,85 эрг/см^2. Анализ показателей поверхностной активности 10%-х растворов МЦ и $ОЭМЦ_{n = 33–35}$ указывает на незначительную их способность к взаимодействию с неполярными компонентами мембран. Температура замерзания $ОЭМЦ_{n = 33–35}$ также повышается. Как видно из табл. 2, коэффициент распределения МЦ соответствует значению 0,121, в то же время коэффициент распределения $ОЭМЦ_{n = 33–35}$ снижается до 0.

Поскольку величина коэффициента распределения мала, то гидрофильность веществ оценивали по гидрофильно-липофильному баллансу (ГЛБ) его молекулы. Для теоретического расчета значений ГЛБ молекул используется состав оксиэтильных производных [23]: $ГЛБ = 11{,}7 \times \lg (M_г/M_л)$, где $M_г$ и $M_л$ – молекулярные массы гидрофильных и липофильных составляющих молекул исследуемых соединений.

Теоретический расчет ГЛБ молекул оксиэтилированных глицеринов показал (табл. 3), что с увеличением степени полимеризации ОЭГ от n = 1 до n = 26 гидрофильность молекул этих соединений повышается. Дальнейшее увеличение степени полимеризации сопровождается незначительным повышением ГЛБ их молекул.

Физико-химические свойства оксиэтилированных производных полиолов, представленные в данной работе, можно разделить на две группы, отражающие способность этих веществ к гидрофобным (поверхностное натяжение, коэффициент распределения в системе вода-н-октанол) и гидрофильным (динамическая вязкость,

температура замерзания) взаимодействиям. Такое разделение объясняется тем, что каждая из этих групп отражает определенный тип межмолекулярных взаимодействий – гидрофобных и гидрофильных. Тип межмолекулярных взаимодействий первой группы (гидрофобные) определяется слабыми вандерваальсовыми силами, энергия которых составляет 1–2 кДж/моль [22]. Вторая группа физико-химических свойств отражает гидрофильные взаимодействия, т. е. взаимодействие гидрофильных групп –ОН, $–CH_2CH_2O$ оксиэтильных производных полиолов как между собой, так и с молекулами воды, а также может характеризовать взаимодействия с гидрофильными частями биомакромолекул. Гидрофильные взаимодействия –это частный случай полярных взаимодействий, определяющихся водородными связями, энергия которых составляет 22–25 кДж/моль [22].

Вода играет важнейшую роль в поддержании структурно-функционального состояния плазматических мембран и других структур клетки, следовательно, изменение фазового состояния воды, вызываемое охлаждением, является одним из значимых факторов их повреждения.

Особенности протекания физических процессов в системе вода-криопротектор, происходящих в процессе охлаждения и ото-

Таблица 3. Показатели ГЛБ молекул глицерина и его оксиэтильных производных

Вещество	Степень полимеризации, n	ГЛБ молекул
Глицерин	–	0,798
ОЭГ	1	4,098
	2	6,097
	3	7,516
	4	8,625
	5	9,534
	25	16,932
	26	17,128
	27	17,299
	28	17,482
	29	17,658
	30	17,828

грева, имеют большое значение для реализации криозащитной активности криопротектора.

Формирование кристаллических и стеклообразных фаз в растворах олигомеров ОЭГ

Исследование фазовых переходов и физических состояний сред, содержащих криопротекторы, а также межмолекулярных взаимодействий между криопротектором и водой является важным этапом изучения механизма их защитного действия.

Физические механизмы действия криопротекторов связывают с их способностью препятствовать формированию кристаллов льда, являющихся одним из наиболее существенных факторов криоповреждения биообъектов, а также понижать температуру затвердевания системы [9, 13]. Благодаря свойству переходить в твердоаморфное состояние при низких температурах некоторые многоатомные спирты (глицерин) успешно используются в качестве криопротекторов при низкотемпературном консервировании биологических объектов [29, 36].

Несмотря на перспективность практического применения в качестве криопротекторов оксиэтильных производных глицерина [14, 15, 17, 20], систематическое исследование фазового поведения водных растворов указанных соединений и межмолекулярных взаимодействий в них до сих пор не проведено. В этой связи изучение формирования стабильных и метастабильных состояний в гидратированных системах на основе ОЭГ с помощью анализа экспериментально полученных диаграмм физических состояний в указанных системах внесет вклад в развитие представлений о фазовых переходах и стекловании в системах с межмолекулярными водородными связями. Кроме того, данное исследование актуально для объяснения физических механизмов криопротекторной эффективности оксиэтилированных производных глицерина.

Исследования фазовых переходов и стеклования в водных растворах оксиэтильных производных глицерина проводили на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном и изготовленном в ИПКиК НАН Украины [10]. Образцы массой 500 мг охлаждали до 77 К погружением в жидкий азот, средняя

скорость охлаждения составляла 3,3 К/с. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью $8{,}3\times10^{-3}$ К/с в температурном диапазоне 140...273 К. Интерпретацию термограмм проводили, как описано ранее [11]. На основании полученных термограмм определяли температуры стеклования и фазовых переходов и строили диаграммы физического состояния исследуемых систем.

Наиболее характерные ДСК-термограммы бинарных систем вода-ОЭГ$_{n=5}$ полученные при нагреве в диапазоне температур 140...273 К, приведены на рис. 1. На термограммах цифрами обозначены тепловые эффекты, отвечающие следующим процессам: 1, 1′ – стеклование; 2 – кристаллизация льда при нагреве из аморфного состояния; 3 – завершение кристаллизации льда при нагреве; 4 – плавление льда. На термограмме системы вода-ОЭГ$_{n=25}$, кроме указанных выше переходов, были зарегистрированы также пики, соответствующие процессам кристаллизации и плавления ОЭГ$_{n=25}$ [11].

На основании анализа термограмм нами были построены диаграммы физических состояний бинарных систем вода-ОЭГ$_{n=5}$ (рис. 2) и вода-ОЭГ$_{n=25}$ (рис. 3). Здесь мы используем термин «диаграмма физических состояний», подчеркивая тем самым, что построенная диаграмма наряду с фазовыми переходами первого рода (кристаллизация, плавление) описывает и переход вещества

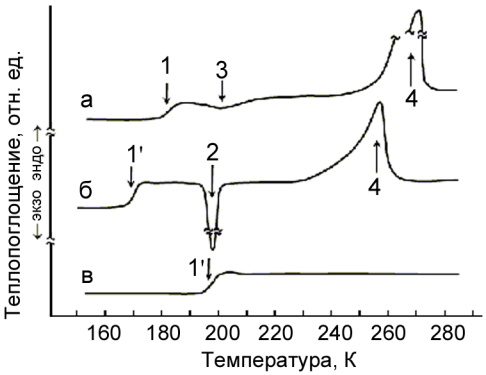


Рис. 1. Характерные термограммы бинарной системы вода-ОЭГ$_{n=5}$, концентрация ОЭГ$_{n=5}$: а) 30%; б) 54%; в) 90%; 1,1′ – стеклование; 2 – кристаллизация льда при нагреве из аморфного состояния; 3 – завершение кристаллизации льда при нагреве; 4 – плавление льда.

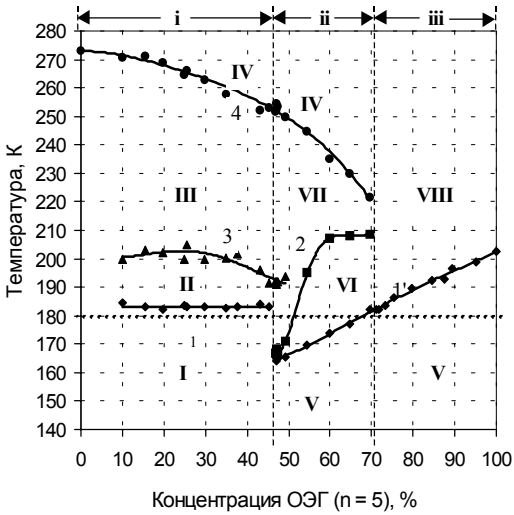


Рис. 2. Диаграмма физических состояний бинарной системы вода-ОЭГ$_{n=5}$. Цифровые обозначения линий соответствуют обозначениям тепловых эффектов на термограммах рис. 1 (см. пояснения в тексте).

из твердоаморфного метастабильного состояния в состояние переохлажденной жидкости («glass transition»).

В зависимости от типа поведения системы вода-ОЭГ$_{n=5}$ диаграмма физических состояний может быть разделена на три концентрационных диапазона, отличающихся друг от друга различными наборами физических состояний системы: диапазон *i* – 0–45%; диапазон *ii* – 46–70%; диапазон *iii* – 71–100%. Приведенные на рис. 1 термограммы характеризуют каждый из вышеупомянутых концентрационных диапазонов.

В концентрационном диапазоне *i* при температурах ниже линии стеклования 1 в области *I* (рис. 2) система представляет собой смесь кристаллов льда и включений водного раствора ОЭГ$_{n=5}$, находящегося в стеклообразном состоянии. Отсутствие зависимости температуры стеклования (линия 1) от концентрации исходного раствора указывает на то, что эти включения имеют постоянный состав. Концентрация ОЭГ$_{n=5}$ в этих включениях составляет 71 %, что следует из точки пересечения линии 1 с линией 1′. Таким образом, можно предположить, что в области *I* стеклуются включения примерно эвтектического состава.

При повышении температуры раствора происходит расстеклование твердых аморфных включений (линия 1), в результате которого затвердевшие в стеклообразном состоянии включения переходят в жидкое состояние. При температуре 201 К (линия 3) наблюдается незначительный рост кристаллов льда, образовавшихся при охлаждении, на что указывает наличие на термограммах (рис. 1, термограмма *а*) слабоинтенсивного размытого экзотермического пика 3. Кристаллы растут за счет молекул воды, получивших подвижность после расстеклования – появления переохлажденной жидкости. В области *III* система находится в стабильном состоянии и представляет собой смесь кристаллов льда и концентрированного раствора $ОЭГ_{n=5}$. Линия 4 соответствует плавлению льда, а область *IV* – жидкому раствору.

В диапазоне средних концентраций (*ii*) в области *V* система при температурах ниже линии стеклования 1′ находится в стеклообразном состоянии, а с повышением температуры переходит в состояние переохлажденной жидкости – область *VI* (рис. 2). При дальнейшем росте температуры в переохлажденном растворе кристаллизуется вода (рис. 2, линия 2), как это видно по интенсивным экзотермическим пикам 2 на термограммах (рис. 1, термограмма *б*). В области *VII* система представляет собой смесь кристаллов льда и 71%-го раствора $ОЭГ_{n=5}$, находящегося в жидком состоянии. Выше линии ликвидуса 4 система находится в жидком состоянии (область *IV*).

Используемая в нашем эксперименте скорость охлаждения оказалась достаточно высокой для того, чтобы избежать кристаллизации воды при охлаждении и перевести систему в метастабильное стеклообразное состояние. В данном случае выполняется условие $\tau_p > \tau_э$, где τ_p – время релаксации; $\tau_э$ – характерное время данного эксперимента (время между двумя последовательными скачками). Однако при медленном нагреве система переходит в стабильное состояние, при котором часть воды кристаллизуется и в системе устанавливается равновесие между кристаллической и жидкой аморфной фазой эвтектического состава. Можно отметить, что состояние системы изменяется равновесно, условием чего является выполнение неравенства $\tau_p << \tau_э$.

В концентрационном диапазоне *iii* при охлаждении ниже температуры стеклования (область *V*) вещество после охлаждения находится полностью в стеклообразном состоянии, а при повышении температуры переходит в жидкое состояние (область *IV*) (рис. 2). Отсутствие кристаллизации при нагреве подтверждается отсутствием экзотермических пиков на термограммах растворов $ОЭГ_{n=5}$, принадлежащих данному концентрационному диапазону (рис. 1, термограмма *в*), а отсутствие кристаллизации при охлаждении – отсутствием эндотермических пиков плавления.

Можно ожидать, что увеличение степени полимеризации молекул ОЭГ приведет к изменению температур фазовых переходов и стеклования, а также появлению новых, не наблюдаемых для системы вода-$ОЭГ_{n=5}$, физических состояний.

Помимо эффектов, описанных выше для системы вода-$ОЭГ_{n=5}$, для системы вода-$ОЭГ_{n=25}$ зарегистрированы экзотермический пик 5, обусловленный кристаллизацией $ОЭГ_{n=25}$ и эндотермический пик 6, идентифицируемый нами как плавление $ОЭГ_{n=25}$ (рис. 3). Эти эффекты наблюдаются в области высоких концентраций $ОЭГ_{n=5}$.

Концентрационные диапазоны *i–iii*, представленные на диаграмме системы вода-$ОЭГ_{n=25}$ аналогичны таковым для диаграммы системы вода-$ОЭГ_{n=5}$, однако на этих диаграммах можно выделить новый концентрационный диапазон *iv* (рис. 3).

В концентрационном диапазоне *iv* выявляется уже описанная область *V*, а также новые области *VIII* и *IX*. В области VIII система вода-$ОЭГ_{n=25}$ после охлаждения находится в состоянии переохлажденной жидкости. Линия 5 соответствует кристаллизации $ОЭГ_{n=25}$. В области *IX* система представляет собой смесь кристаллов $ОЭГ_{n=25}$ (рис. 3) и концентрированного раствора, имеющего концентрацию около 76 % в случае $ОЭГ_{n=25}$. Линия 6 является второй ветвью линии ликвидуса. Выше этой линии система находится в жидком состоянии (область *IV*).

Процессы, протекающие в концентрационном диапазоне *iv*, имеют сходство с процессами в диапазоне *ii*. В обоих концентрационных диапазонах вследствие использования высоких скоростей охлаждения система избегала кристаллизации при охлаждении, которая однако регистрировалась при последующем нагреве со

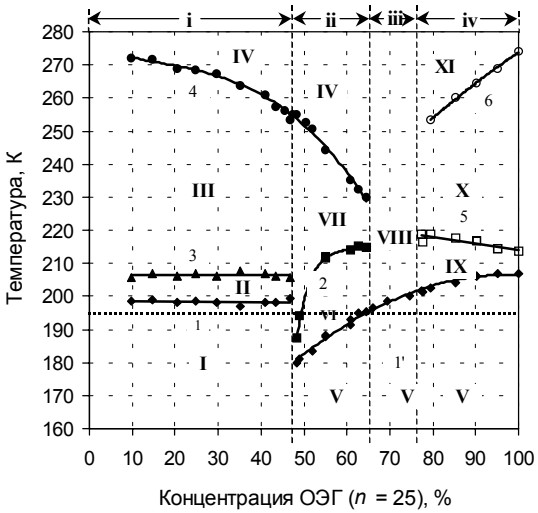


Рис. 3. Диаграмма физических состояний бинарной системы вода-ОЭГ$_{n=25}$. Цифровые обозначения линий соответствуют обозначениям тепловых эффектов на термограммах рис. 2 (см. пояснения в тексте).

значительно более низкими скоростями. Следует подчеркнуть, что если в концентрационном диапазоне *ii* при нагреве происходила кристаллизация воды, то в диапазоне *iv* наблюдалась кристаллизация ОЭГ$_{n=25}$ (рис. 3). Выше линии 5 установилось равновесие между кристаллической фазой и жидким раствором, имеющим концентрацию 76% ОЭГ$_{n=25}$.

Таким образом, исследуемые бинарные системы вода-ОЭГ$_{n=5}$, вода-ОЭГ$_{n=25}$ имеют высокую склонность к стеклованию, при охлаждении они представляют собой гетерогенные системы, включающие аморфную и кристаллическую фазы, или гомогенные аморфные [6]. С увеличением степени полимеризации ОЭГ (ОЭГ$_{n=30}$) наблюдается возрастание значений температур фазовых переходов и стеклования.

Интересные данные получены при изучении процесса кристаллизации бинарной системы вода-ОЭГ методом криомикроскопии [7]. Результаты исследования физических состояний бинарных систем вода-ОЭГ$_{n=5}$ и вода-ОЭГ$_{n=25}$ в диапазоне температур 173...273 К показали, что при низких (зона *i*) и средних (зона *ii*)

концентрациях ОЭГ наблюдалось формирование как кристаллической, так и аморфной фаз, соотношение которых зависит от концентрации. Причем в зоне *ii* формирующиеся кристаллы имели вид дендритов первого, второго и более высоких порядков. В зоне *iii* системы затвердевали в полностью аморфном состоянии и сохраняли ближний порядок при нагреве. В зоне *iv*, характерной только для второй системы, наблюдалась кристаллизация $ОЭГ_{n=25}$ в виде формирования сетчатой структуры. В диапазоне высоких концентраций $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ кристаллизуется неводный компонент в виде сетчатой структуры из тонких, длинных, случайным образом ориентированных кристаллов [8].

Результаты исследования взаимодействия ОЭГ с водой представляют особый интерес. Предполагается, что криозащитная активность криопротекторов разного типа обусловлена их гидратационными свойствами. Известно, что способность криопротекторов образовывать водородные связи с водой влияет на формирование кристаллической решетки льда и процесс витрификации криобиологической системы. Методом ИК-спектроскопии, а также на основании результатов анализа фазовых диаграмм исследована гидратация молекул ОЭГ [8].

Изучение водных растворов $ОЭГ_{n=5}$, $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ показало, что увеличение степени полимеризации приводит к увеличению способности молекул ОЭГ к гидрофильным взаимодействиям. Установлено, что одна молекула $ОЭГ_{n=5}$ связывает 20–21 молекулу воды, из них 6–7 сильно; $ОЭГ_{n=25}$ – 71–72, из них 35–36 сильно; молекула $ОЭГ_{n=30}$ – 92–93, из них 47–48 сильно.

При известных молекулярных массах $ОЭГ_{n=5}$ – 312, $ОЭГ_{n=25}$ – 1192 и $ОЭГ_{n=30}$ – 1412 несложно рассчитать количество молекул воды, которое приходится на каждую молекулу ОЭГ и каждый центр связывания на границах концентрационных зон (табл. 4). В соответствии с расчетами на каждый центр связывания приходится около трех молекул воды, из которых 1–2 связываются сильно. В зоне *iv* на каждый центр связывания приходится меньше одной молекулы воды. Эти данные свидетельствуют о том, что в диапазоне высоких концентраций олигомеров (80–100%) вода не способна кристаллизоваться, т. е. экзо- и эндотермические пики

Таблица 4. Количество молекул воды на молекулу ОЭГ и центр связывания

Степень полимеризации ОЭГ, n	Граница зон i и ii		Граница зон ii и iii		Граница зон iii и iv	
	Количество молекул воды					
	на молекулу ОЭГ	на центр связывания	на молекулу ОЭГ	на центр связывания	на молекулу ОЭГ	на центр связывания
5	20–21	3	6–7	1	–	–
25	71–72	2–3	35–36	1–2	19–20	0–1
30	92	2–3	48	1–2	26–27	0–1

могут рассматриваться как процессы кристаллизации и плавления ОЭГ.

Таким образом, водные растворы ОЭГ всех исследуемых степеней полимеризации демонстрируют высокую склонность к стеклованию, что объясняется содержанием в составе молекул ОЭГ большого количества полярных групп, способных к формированию водородных связей с водой.

Криопротекторные свойства оксиэтилированных производных спиртов

Приведенные выше данные о физико-химических свойствах водных растворов оксиэтилированных производных спиртов, характере их влияния на кристаллизационные процессы, происходящие в криозащитных растворах в цикле замораживания-оттаивания позволяют отнести эти вещества к перспективным криопротекторам, криозащитная активность которых до конца не исследована.

В литературе имеются немногочисленные данные о криопротекторной активности полимергомологов оксиэтилированного глицерина и оксиэтилированного метилцеллозольва при замораживании различных биологических объектов, свидетельствующие об их высокой криозащитной эффективности [5, 14, 15, 17, 18, 21, 26].

При этом особого внимания заслуживают результаты применения этих соединений в качестве криопротекторов при замораживании клеток крови человека – эритроцитов, тромбоцитов.

Целесообразность более детального изучения криозащитного действия олигомеров ОЭГ при замораживании клеток крови обусловлена тем, что мономером для синтеза этих непроникающих в клетку соединений является глицерин – один из наиболее популярных и эффективных криопротекторов для низкотемпературного консервирования различных биологических объектов. Накоплен положительный опыт применения глицерина при криоконсервировании эритроцитов и костного мозга для клинической практики. Однако существенный его недостаток – необходимость удаления из клеточной взвеси после размораживания перед введением в изоосмотическую среду. Эта кропотливая, длительная, трудоемкая и дорогостоящая процедура приводит к дополнительной травматизации и потере клеток. Поиск новых эффективных криопротекторов экстрацеллюлярного действия, не требующих удаления перед трансфузией, по-прежнему является нерешенной задачей в области криоконсервирования клеток крови.

В последние годы отмечен значительный рост экспериментальных работ по разработке криоконсервантов для эритроцитов на основе непроникающих соединений [30, 32–35].

Процесс низкотемпературного консервирования эритроцитов включает несколько этапов, в том числе этап подготовки к замораживанию. На первое место по риску развития повреждения клеток на этапе подготовки следует отнести их экспозицию с криозащитными растворами, в процессе которой криопротекторы могут оказывать цитотоксическое действие и таким образом индуцировать изменения и повреждения клеток, в том числе латентные, и быть причиной развития криоповреждений эритроцитов на следующих этапах криоконсервирования.

Цитотоксическое действие олигомеров ОЭГ ($ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$) на эритроциты исследовано для 60 мин экспозиции с различными концентрациями веществ при температуре 20°С. Контролем являлись свежевыделенные эритроциты, разведенные изотоническим раствором NaCl (1:1) и инкубированные при тех же условиях.

Таблица 5. Влияние экспозиции при 20°С в растворах $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ на сохранность эритроцитов (M ± S, *n* = 5)

Вещество	Показатели сохранности, %				
	Концентрация, %	Гемолиз	Осмотическая хрупкость		Гематокрит
			0,6% NaCl	0,9% NaCl	
Без криопротектора (контроль)	-	0,02 ± 0,01	2,0 ± 0,04	0,76 ± 0,42	37,4 ± 2,19
$ОЭГ_{n=25}$	20	0,03 ± 0,01	0,6 ± 0,21*	0,5 ± 0,08	26,2 ± 1,6*
	30	0,05 ± 0,02	1,3 ± 0,12*	0,4 ± 0,05	27 ± 1,41*
	40	0,08 ± 0,02*	3,2 ± 1,1	0,7 ± 0,1	25,8 ± 2,04*
$ОЭГ_{n=30}$	20	0,04 ± 0,02	0,5 ± 0,11*	0,6 ± 0,02	27,8 ± 1,73*
	30	0,05 ± 0,01	1,1 ± 0,22*	0,5 ± 0,3	27,6 ± 1,80*
	40	0,06 ± 0,02*	2,4 ± 1	0,9 ± 0,3	24,8 ± 1,91*

Примечание. * – отличия статистически достоверны по сравнению с показателем для контроля, $p \leq 0,05$ (статистический анализ результатов проведен с использованием критерия Манна-Уитни).

Как следует из данных (табл. 5), 60-минутная экспозиции эритроцитов с 20 и 30%-ми (м/м) растворами испытуемых веществ практически не влияет на показатели их гемолиза и осмотической хрупкости, тогда как экспозиция с 40%-ми растворами $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ приводит к незначительному увеличению уровня этих параметров.

Уменьшение осмотической хрупкости эритроцитов после экспозиции с растворами олигомеров ОЭГ (табл. 5) обусловлено, по-видимому, способностью этих соединений адсорбироваться на мембране эритроцитов и таким образом препятствовать выходу гемоглобина из клеток. Снижение показателя гематокрита объяс-

няется обезвоживанием (эффект дегидратации) эритроцитов под действием непроникающих криопротекторов.

При исследовании морфологической формы эритроцитов после экспозиции с растворами $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ выявлены различные её изменения в зависимости от молекулярной массы и концентрации этих веществ. Так, под воздействием 20%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$ наблюдалась трансформация эритроцитов в дискоциты с гребнями различной формы, а также эхиноциты и стоматоциты (рис. 4, А), а после экспозиции с 30%-м раствором $ОЭГ_{n=25}$ большинство эритроцитов имело форму дискоцитов с неровными контурами, также отмечена незначительная трансформация клеток в стоматоциты (рис. 4, Б).

Экспозиция эритроцитов с растворами $ОЭГ_{n=30}$ приводила к более значительным изменениям формы клеток. Так, после 60-минутной инкубации с 20%-м раствором $ОЭГ_{n=30}$ появлялись сферические эритроциты с гладкой поверхностью и выростами различной величины, тогда как после экспозиции с 30%-м раствором $ОЭГ_{n=30}$ наблюдались уплощение эритроцитов, образование стоматоцитов и кодоцитов, а также появление незначительного количества эхиноцитов. Экспозиция эритроцитов в 40%-х растворах

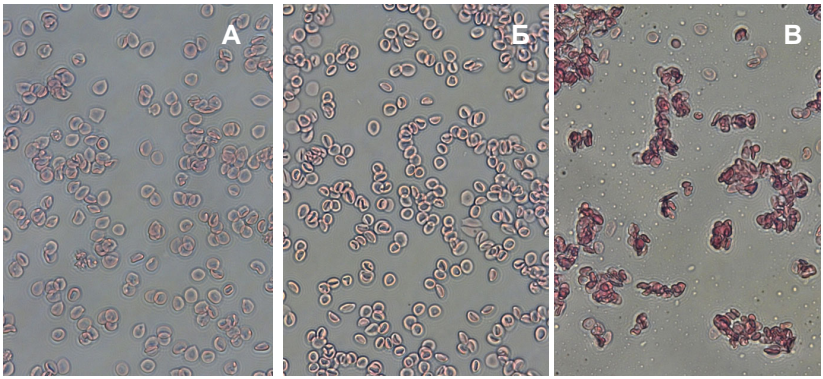


Рис. 4. Морфологические изменения эритроцитов после экспозиции в растворах $ОЭГ_{n=25}$: А – 20%; Б – 30%; В – 40%; ×500.

$ОЭГ_{n=25}$ (рис. 4, В) и $ОЭГ_{n=30}$ вызывала агрегацию эритроцитов и изменения формы, что было наиболее выражено для $ОЭГ_{n=30}$.

Согласно фазовой теории ассоциации эритроцитов [3], агрегация клеток в растворах водорастворимых полимеров может быть обусловлена явлением коацервации. Данное явление реализуется лишь при условии превышения некоторого критического значения концентрации полимерных молекул в растворе, зависит от свойств полимера [4, 31], низкомолекулярных компонентов раствора и самих эритроцитов [37]. Одним из факторов агрегации эритроцитов в растворах непроникающих криопротекторов может быть способность молекул криопротекторов влиять на липидные компоненты мембран и таким образом изменять ее вязкоэластичные свойства [38].

Таким образом, сравнительный анализ изменения формы эритроцитов под действием 20, 30 и 40%-х растворов $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ при температуре 20°С показал, что использование 20 и 30%-й концентрации $ОЭГ_{n=25}$ в растворе обеспечивает наименее выраженные морфологические изменения формы клеток.

Анализ результатов исследования криопротекторных свойств растворов $ОЭГ_{n=25}$, $ОЭГ_{n=30}$ и $ОЭМЦ_{n=33–35}$ на этапе замораживания-отогрева эритроцитов показал, что наиболее высокий уровень сохранности эритроцитов по показателям гемолиза и осмотической хрупкости получен при использовании 30%-й концентрации $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ в криозащитных растворах (табл. 6). При замораживании эритроцитов с 20, 30 и 40%-ми растворами $ОЭМЦ_{n=33–35}$ на фоне относительно низкого уровня гемолиза выявлены высокие показатели их осмотической хрупкости, что может свидетельствовать о более значительном повреждении клеток в процессе замораживания-отогрева.

После криоконсервирования эритроцитов в растворах 20% $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ отмечены присутствие сферических эритроцитов с гладкой поверхностью и мелкими выростами и незначительное присутствие стоматоцитов и эхиноцитов (рис. 5). Однако преобладающей формой эритроцитов была дискоидная, при этом клетки не утрачивали способность складываться в «монетные столбики». Замораживание-отогрев эритроцитов в 30%-х раст-

Таблица 6. Сохранность эритроцитов после криоконсервирования в криозащитных растворах $ОЭГ_{n=2}5$ и $ОЭГ_{n=30}$ (M ± S, n = 5)

Вещество	Показатели сохранности, %				
	Концентрация, %	Гемолиз	Осмотическая хрупкость		Гематокрит
			0,6% NaCl	0,9% NaCl	
Без криопротектора без замораживания (контроль)	–	0,02 ± 0,01	2,0 ± 0,04	0,76 ± 0,42	37,4 ± 2,19
Глицерин	30	3,7 ± 2,5	14,7 ± 3,1	11,4 ± 1,5	30,0 ± 1,4
$ОЭГ_{n=25}$	20	4,3 ± 2,0	26,3 ± 3,39	22,2 ± 2,15	26,1 ± 1,61
	30	2,4 ± 1,43	12,9 ± 1,25	10 ± 2,32	25,6 ± 3,59
	40	3,7 ± 0,8	40 ± 8,43	24,4 ± 2,42	29,6 ± 5,1
$ОЭГ_{n=30}$	20	3,6 ± 1,0	20 ± 2,35	18,9 ± 2,02	27,6 ± 1,46
	30	2,0 ± 1,0	17,4 ± 3,41	10,7 ± 1,76	25,3 ± 3,88
	40	3,5 ± 2,39	39,7 ± 5,75	30,4 ± 7,48	28,0 ± 2,97
$ОЭМЦ_{n=33-35}$	20	4,3 ± 0,5	41 ± 1,1	40,0 ± 1,3	30,1 ± 1,0
	30	1,6 ± 0,03	25,2 ± 12,7	21,6 ± 8,8	28,7 ± 2,3
	40	1,5 ± 0,01	37,1 ± 2,7	30,8 ± 2,2	21,0 ± 1,5

ворах $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ способствовало увеличению количества дискоцитов различной формы, а именно отмечено присутствие двояковогнутых дискоцитов и дискоцитов с неровными контурами (рис. 6). Наблюдалось присутствие эхиноцитов и незначительное количество эритроцитов сферической формы. Кроме того, эритроциты, криоконсервированные в 20 и 30%-х растворах $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$, после их размораживания и перенесения в плазмо-

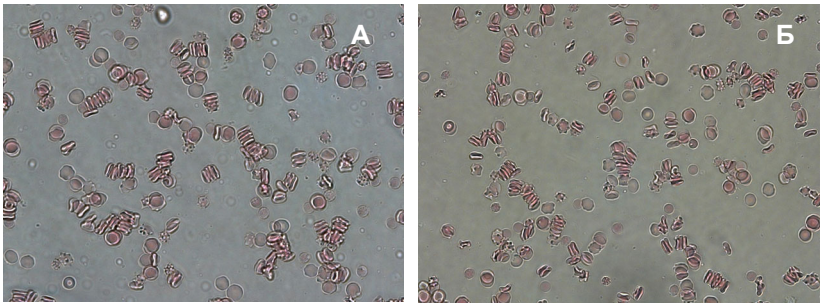


Рис. 5. Морфологические изменения эритроцитов после замораживания-отогрева в 20%-х растворах ОЭГ$_{n = 25}$ (А) и ОЭГ$_{n = 30}$ (Б); модель трансфузии; ×500.

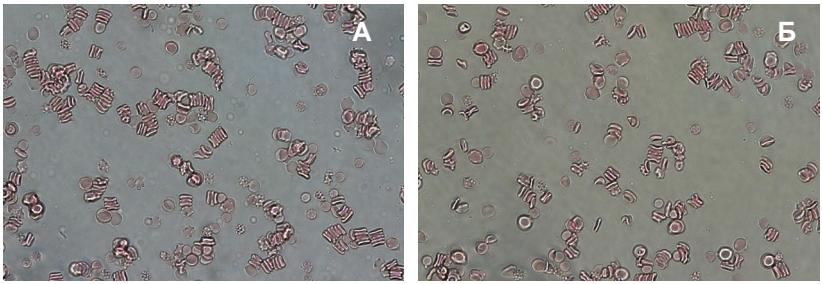


Рис. 6. Морфологические изменения эритроцитов после замораживания-отогрева в 30%-х растворах ОЭГ$_{n = 25}$ (А) и ОЭГ$_{n = 30}$ (Б); модель трансфузии; ×500.

замещающий раствор ЦОЛИПК-8в характеризовались способностью к формированию агрегатов по типу «монетных столбиков» (рис. 5 и 6).

Таким образом, эффективность криоконсервирования эритроцитов с оксиэтильными производными полиолов зависит от концентрации ОЭГ в растворе и степени его полимеризации. Наиболее высокий уровень сохранности криоконсервированных эритроцитов донорской крови человека получен после их замораживания-отогрева в 30%-х растворах ОЭГ$_{n=25}$ и ОЭГ$_{n=30}$. Самыми высокими показателями осмотической устойчивости характеризовались

эритроциты, криоконсервированные в 30%-м растворе $ОЭГ_{n=25}$. После замораживания-отогрева в 30%-х растворах $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ значительное количество эритроцитов имело двояковогнутую дискоидную форму и не утрачивало способности собираться в агрегаты по типу «монетных столбиков».

Приведенные данные о физико-химических и криозащитных свойствах оксиэтильных производных глицерина и метилцеллозольва позволяют отнести эти вещества к перспективным криопротекторам, криозащитная активность которых до конца не исследована. Результаты исследований свидетельствуют, в частности, о высокой криозащитной активности олигомеров ОЭГ при замораживании клеток крови, что позволяет рекомендовать эти соединения в качестве непроникающих криопротекторов для разработки на их основе криозащитных сред для замораживания компонентов донорской крови человека.

Литература

1. Альбертсон П.О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. – М.: Мир, 1974. – 382 с.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С Криоконсерванты. – Киев: Наук. думка, 1979. – 197 с.
3. Воейков В.Л. Физико–химические и физиологические аспекты реакции оседания эритроцитов // Успехи физиологических наук. – 1998. – Т. 29, №4. – С. 68–73.
4. Воюцкий С.С. Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии. – М.: Химия, 1974. – 224 с.
5. Есипова Ю.С., Николенко А.В., Чеканова В.В., Компаниец А.М. Влияние оксиэтилированных производных глицерина на устойчивость эритроцитов к действию гипертонического стресса // Материалы VII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – 2011. – С. 76–77.
6. Животова Е.Н., Зинченко А.В., Чеканова В.В., Компаниец А.М. Термический анализ бинарных систем вода – оксиэтилированный глицерин (степень полимеризации n = 5 и 25) при температурах ниже 273 К // Доп. НАН України. – 2006. – №9. – С. 74–79.
7. Животова Е.Н., Кулешова Л. Г., Зинченко А.В., Чеканова В.В. Исследование физических состояний бинарных систем вода–оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации n = 5 и 25 при температурах ниже 273 К методом криомикроскопии // Доп. НАН України. – 2007. – №4. – С. 78–84.
8. Животова Е.Н., Зинченко А.В., Кулешова Л.Г. и др. Фазовые переходы и стеклование в водных растворах оксиэтилированного глицерина при температурах ниже 273К // Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 52–53.
9. Жмакин А.И. Физические основы криобиологии // Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178, №3. – С. 243–266.

10. Зинченко А.В., Моисеев В.А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом // Криобиология и криомедицина. – 1979. – Вып. 5. – С. 27–30.
11. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур –196 – 0°С: Автореф. дис. … канд. физ-мат. наук. – Харьков, 1983. – 22 с.
12. Измайлов Н.А. Электрохимия растворов. – Харьков: ХГУ, 1959. – С. 221–222.
13. Иткин С.А., Бронштейн В.Л., Гордиенко Е.А., Марценюк В.Ф. Замораживание, факторы, механизмы и гипотезы повреждения биологических объектов // Криоконсервирование клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1983. – С. 26–44.
14. Компаниец А.М., Николенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П. Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3.– С. 561–565.
15. Компанієць А.М., Ніколенко О.В., Чеканова В.В., Єсіпова Ю.С. Кріозахисна ефективність середовищ на основі оксиетильних похідних поліолів при заморожуванні еритроцитів людини // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 299–301.
16. Кочуровская Г.Г., Матвиец Н.М., Лубяный В.Г. Некоторые аспекты оксиэтилирования полиолов // Криобиология и криомедицина. – 1977. – Вып. 3. – С. 76–78.
17. Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов // Криобиология и криомедицина. – 1981. – Вып. 8. – С. 34–40.
18. Луговой В.И., Кравченко Л.П., Семенченко О.А. Влияние криопротекторов и мембраностабилизирующих веществ на лизосомы при замораживании // Криобиология и криомедицина. – 1980. – Вып. 7. – С. 45–48.
19. Моисеев В.А. Молекулярные механизмы криоповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. … докт. биол. наук. – Харьков, 1984. – 47 с.
20. Николенко А.В. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов человека: Автореф. дис. … канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 17 с.
21. Паращук Ю.С., Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. Влияние различных условий криоконсервации на выживаемость спермиев человека // Криобиология. – 1985. – №4. – С. 26–27.
22. Шахпоронов М.И. Введение в современную теорию растворов. – М.: Высш. шк., 1975. – 296 с.
23. Шенфельд Н. Поверхностно-активные соединения на основе окиси этилена. – М.: Химия, 1982. – 747с.
24. Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В. Некоторые принципы направленного синтеза криопротекторов // Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С. Пушкаря и А.М. Белоуса.– Киев: Наук. думка, 1981. – С. 157–201.
25. Шраго М.И., Новиков А.Н., Ханина Л.Н. и др. Криопротекторы и криоконсерванты (основные направления исследований) // Криобиология. – 1985. – №3. – С. 8–13.
26. Пат. 7845 Україна, МПК4 A01N1/00. Середовище для консервування клітинних культур / М.І. Шраго, Л.А. Ханіна, Ю.В. Калугін та ін.; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – № 3732756/SU; заявл. 18.04.84; опубл. 26.12.95. Бюл. №4.
27. Пат. 14078 Україна, МПК5 A61 N1/02. Кріопротектор еритроцитів людини / Л.П. Бредіхіна, О.В. Ліпіна, Л.А. Ханіна та ін.; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – № 4489413/SU; заявл. 03.10.88; опубл. 25.04.97. Бюл. №2.
28. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, №1. – P. 45–53.
29. Fuller B.J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25, №6. – P. 375–388.

30. Lynch A.L., Chen R., Dominowski P.J. et al. Biopolymer mediated trehalose uptake for enhanced erythrocyte cryosurvival // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, №23. – P. 6096–6103.
31. Miheeva L.M., Zaslavsky B.Y., Rogozhin S.V. Choice of an aqueous polymer two-phase system for cell partition // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – Vol. 542, №1. – P. 101–106.
32. Quan G., Zhang B. L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreservation at –80°C in the presence of polyvinylpyrrolidone and human serum albumin // CryoLetters. – 2008. – Vol. 28, №2. – P. 95–108.
33. Sputtek A., Langer R., Singbartl G. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starh // CryoLetters. – 1995. – Vol. 16, №4. – P. 283–288.
34. Sputtek A., Kuehnl P., Rowe A.W. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes // Transfus. Med. Hemother. – 2007. – Vol. 34, №4. – P. 262–267.
35. Stoll Ch., Wolkers W.F. Membrane stability during biopreservation of blood cells // Transfus. Med. Hemother. – 2011. – Vol. 38, №1. – P. 89–97.
36. Vigier G., Vassoille R. Ice nucleation and crystallization in water-glycerol mixture // Cryobiology. – 1987. – Vol. 24. – P. 345–354.
37. Weng X., Cloutier G., Pibarot P., Durand L.G. Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood // Biorheology. – 1996.– Vol. 33, №4. – P. 365–377.
38. Walter H., Krob E.J., Brooks D.E. Membrane surface properties other than charge involved in cell separation by partition in polymer, aqueous two-phase systems // Biochemistry. – 1976. – Vol. 15, №14. – P. 2959–2964.

Криозащитные среды на основе комбинаций криопротекторов для замораживания биологических объектов

А.М. Компаниец*, О.А. Богданчикова,
Ю.С. Пахомова, С.Е. Овсянников, Т.Ф. Стрибуль

Отдел криопротекторов
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: a.m.kompaniets@gmail.com*

Способы и технологии криоконсервирования биологического материала основываются на использовании разных по составу криозащитных сред – криоконсервантов, главным компонентом которых является криопротектор.

В последние годы активно разрабатываются новые методы создания эффективных криозащитных сред для низкотемпературного консервирования различных клеток и тканей. Один из них заключается в использовании комбинаций 2-х и более криопротекторов в криоконсерванте, другой – в поиске веществ, способных оказывать избирательное стабилизирующее действие на структурные компоненты клеточной мембраны [3, 9, 12, 33, 35, 53]. Рациональность таких подходов обусловлена их направленностью на снижение цитотоксического действия криоконсервантов, достижение условий витрификации криозащитной среды, повышение устойчивости мембран и других клеточных структур к действию факторов криоповреждения [2, 17, 32, 39].

Установлено, что использование криоконсервантов, содержащих комбинации криопротекторов, способствует получению высоких результатов криоконсервирования стволовых клеток перифе-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 101–126.
© А.М. Компаниец, О.А. Богданчикова, Ю.С. Пахомова и др., 2012

рической крови и костного мозга человека [34, 47], гемопоэтических клеток кордовой крови [43], эритроцитов [22], клеток поджелудочной железы [44], гепатоцитов [21]. Применение комбинированных криоконсервантов позволило повысить эффективность криоконсервирования тромбоцитов человека [3, 9], спермиев птиц и животных [12, 24], меристем растений [29].

Используемые сокращения
1,2-ПД – 1,2-пропандиол
АДФ – аденозин-дифосфорной кислоты динатриевая соль
ДМАЦ – диметилацетамид
ДМСО – диметилсульфоксид
ГЭК – гидроксиэтилкрахмал
КТ – концентрат тромбоцитов
$ОЭГ_{n=x}$, $ОЭГ_{n=25}$, $ОЭГ_{n=30}$ – оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации *x*
ПВП – поливинилпироллидон
РГШ – реакция на гипотонический шок

Особого внимания заслуживают результаты использования комбинированных криоконсервантов при замораживании концентратов тромбоцитов (КТ) донорской крови человека.

Известно, что токсичность криопротекторов является одним из основных лимитирующих факторов эффективного криоконсервирования тромбоцитов [9, 10, 18, 36, 52]. Чрезвычайная лабильность, низкая устойчивость тромбоцитов к разным воздействиям, особенно к действию химических веществ, существенно ограничивает спектр криопротекторов и диапазон их концентраций, используемых при замораживании. Оптимизация методов криоконсервирования КТ осуществляется, в основном, за счет модификации состава криозащитных сред, однако результаты замораживания тромбоцитов такой подход существенно не улучшил. Так, увеличение или снижение концентрации криопротекторов (диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин) в криозащитной среде, введение в состав криоконсерванта биологически активных веществ (ингибиторы активации, стимуляторы энергетического обмена, антиоксиданты и др.) оказались малоэффективными [31–33, 35, 36, 53]. Неудовлетворительные результаты были получены при использовании растворов, содержащих ДМСО в комбинации с поливинилпироллидоном (ПВП) или гидроксиэтилкрахмалом (ГЭК) и глицерин в комбинации с декстраном [23, 31, 32, 35, 45]. Некоторый успех был достигнут лишь при сочетании в криоконсерванте ДМСО

с тромбоцит-стабилизирующим раствором «TromboSol» – удалось снизить концентрацию ДМСО до 2%, однако значительного повышения сохранности и лечебной эффективности криоконсервированных тромбоцитов по сравнению с результатами их замораживания в 6%-м растворе ДМСО («золотой стандарт») достигнуто не было [33, 41, 52].

В отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины при разработке криоконсервантов для замораживания тромбоцитов был использован принцип сочетания в криозащитном растворе двух криопротекторов в различных комбинациях [3, 9]. Исследованы растворы, содержащие комбинации диметилацетамида (ДМАЦ) с 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), глицерином и оксиэтилированным глицерином n = 5 ($ОЭГ_{n=5}$), а также 1,2-ПД с глицерином и $ОЭГ_{n=5}$. Выбор криопротекторов обусловлен тем, что ДМАЦ и глицерин длительное время применяются в технологиях криоконсервирования КТ для клинической практики, а на основе 1,2-ПД и $ОЭГ_{n=5}$ разработаны методы криоконсервирования КТ, прошедшие доклинические испытания [5, 8, 18, 26, 28, 42]. Дополнительным контролем эффективности комбинированных криоконсервантов было криоконсервирование КТ с ДМСО. Перед проведением исследований криопротекторы удаляли из суспензии тромбоцитов разработанным нами способом [27].

При изучении цитотоксичности комбинированных растворов криопротекторов установлена её зависимость от концентрации веществ и длительности экспозиции. Так, комбинированные растворы ДМАЦ/1,2-ПД; ДМАЦ/глицерин; ДМАЦ/$ОЭГ_{n=5}$; 1,2-ПД/глицерин и 1,2-ПД/$ОЭГ_{n=5}$, содержащие 5 и 10%-ю суммарную концентрацию криопротекторов, практически не оказывали влияния на функциональные свойства тромбоцитов при длительности экспозиции не более 30 мин. Однако после экспозиции КТ с 15%-ми растворами при всех вариантах комбинаций криопротекторов или после 60-минутной экспозиции наблюдалось значительное снижение показателей функциональной полноценности тромбоцитов, в частности агрегации, индуцированной аденозин-дифосфорной кислотой динатриевой солью (АДФ) и коллагеном, а также реакции на гипотонический шок (РГШ) [3].

Сравнительный анализ цитотоксичности комбинированных растворов и растворов отдельных криопротекторов показал, что последние оказывают более значительное влияние на параметры агрегации и РГШ тромбоцитов. Так, 10%-е растворы ДМАЦ и ДМСО подавляли способность тромбоцитов к агрегации и РГШ, а 10%-й раствор 1,2-ПД активировал агрегацию, при этом показатели РГШ снижались (рис. 1).

Более низкая цитотоксичность комбинированных сред объясняется тем, что они содержат вдвое меньшую концентрацию (5%) каждого из 2-х веществ, по сравнению с концентрацией (10%) в растворах отдельных криопротекторов. Суммарное же воздействие комбинаций криопротекторов сходно с действием на тромбоциты 5%-й концентрации в растворах отдельных криопротекторов [8, 10, 18, 35], следовательно, сочетание в криозащитных растворах 2-х криопротекторов (из числа исследованных) не приводит к суммированию или потенцированию их цитотоксичности на этапе экс-

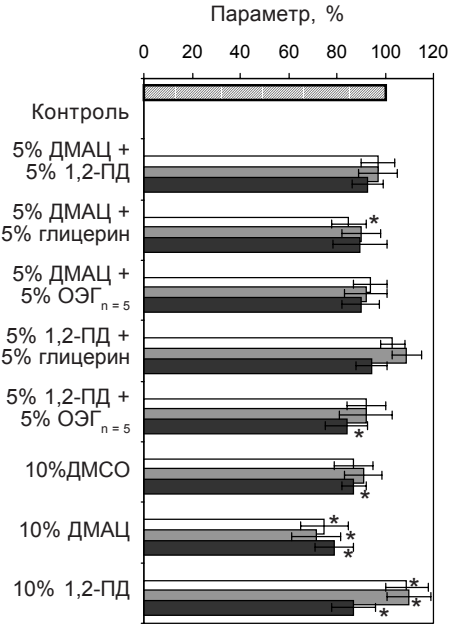


Рис. 1. Функциональные свойства тромбоцитов после 30-минутной экспозиции с криозащитными средами (M±S, *n* = 5; контроль – показатели функциональных свойств тромбоцитов, выделенных из донорской крови методом из лейкотромбоцитарного слоя, принятые за 100%; □ – АДФ-агрегация; ▒ – коллаген-агрегация; ■ – РГШ; * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$).

позиции. Более того, комбинация криопротекторов в растворе, по-видимому, в некоторой степени корригирует характер влияния каждого из них на функциональные свойства тромбоцитов, в частности, уменьшает угнетающее действие ДМАЦ и активирующее – 1,2-ПД.

Изучение криопротекторных свойств комбинированных растворов при замораживании тромбоцитов с учетом состава криоконсерванта и суммарной концентрации криопротекторов, времени экспозиции, условий введения криоконсерванта в клеточную суспензию, режима охлаждения позволило установить следующее.

Во-первых, высоким уровнем криозащитного действия характеризовались криоконсерванты, содержащие различные комбинации ДМАЦ с криопротекторами глицерином, 1,2-ПД или $ОЭГ_{n=5}$, наиболее эффективной была 10%-я суммарная концентрация веществ (рис. 2). Криопротекторная активность растворов, содержащих комбинации 1,2-ПД с глицерином или $ОЭГ_{n=5}$, была низкой.

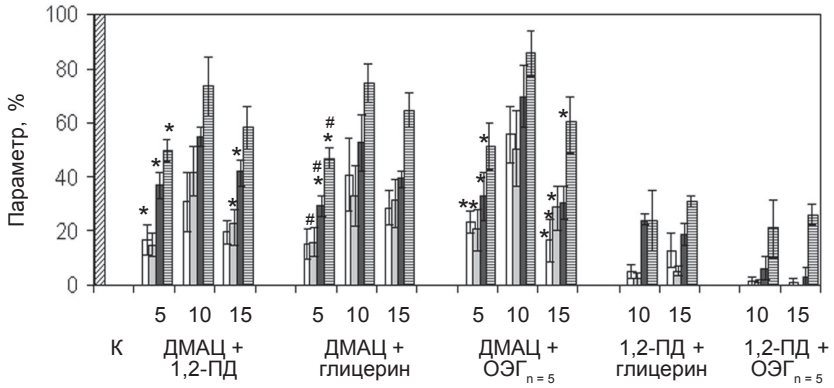


Рис. 2. Функциональные свойства тромбоцитов после криоконсервирования с комбинированными средами в зависимости от состава и концентрации (%) криопротекторов (M ± S, n = 5; К – контроль, показатели функциональных свойств тромбоцитов, выделенных из донорской крови методом из лейкотромбоцитарного слоя, принятые за 100%; □ – АДФ-агрегация; ▩ – коллаген-агрегация; ■ – РГШ; ▭ – ретракция; * – отличия статистически достоверны по сравнению с показателем для 10%; # – отличия статистически достоверны по сравнению с показателем для 15%, p < 0,05).

Во-вторых, определено важное значение фактора длительности экспозиции для результатов криоконсервирования КТ с комбинированными криоконсервантами. Можно предположить, что при взаимодействии клеток с многокомпонентными криозащитными растворами происходят различные процессы – активация тромбоцитов, осмотический стресс различной степени, перераспределение воды во внутри- и внеклеточном пространстве под воздействием криопротекторов, с разной скоростью проникающих через клеточную мембрану и отличающихся механизмом взаимодействия с клеточными структурами и мембраной. Экспериментально установлено, что 30-минутная экспозиция является оптимальной, поскольку в течение этого времени наступает определенное равновесие (адаптация) тромбоцитов к транзиторным эффектам, развивающимся при добавлении растворов криопротекторов.

Эффективность криоконсервирования КТ в комбинированных криозащитных средах исследована после традиционного для тромбоцитов контролируемого замораживания в программном замораживателе, а также неконтролируемого – в парах азота с низкими и относительно высокими скоростями охлаждения.

Анализ полученных данных показал высокую криозащитную активность комбинированных сред как при программном контролируемом замораживании КТ, так и неконтролируемом [4]. Экспериментально установлена возможность неконтролируемого замораживания в парах жидкого азота для эффективного криоконсервирования тромбоцитов в комбинированных средах. Разработана методика неконтролируемого замораживания отдельных доз КТ в одноразовых полимерных криоконтейнерах. Криоконсервирование КТ в комбинированных криозащитных средах (ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/глицерин и ДМАЦ/$ОЭГ_{n=5}$) с охлаждением по разработанной методике значительно повысило сохранность функциональных свойств тромбоцитов по сравнению с использованием отдельных растворов этих криопротекторов, а также ДМСО (рис. 3). Наиболее высокие и стабильные результаты были получены при использовании криозащитного раствора, содержащего комбинацию проникающего амида ДМАЦ и криопротектора смешанного типа $ОЭГ_{n=5}$.

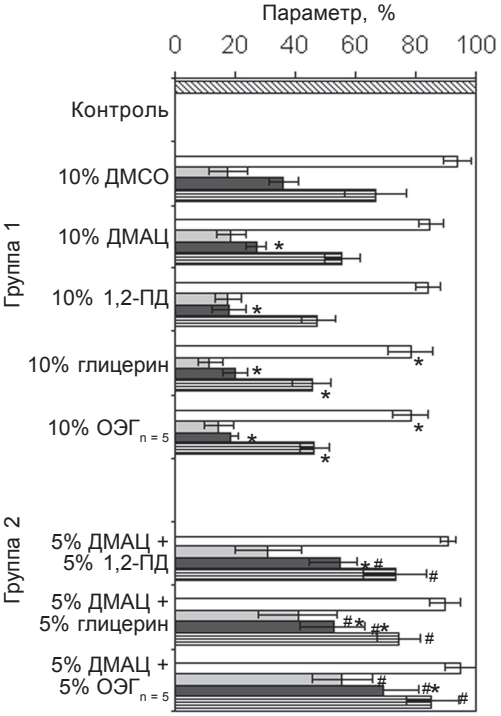


Рис. 3. Количество и функциональные свойства тромбоцитов после криоконсервирования с растворами отдельных криопротекторов (группа 1) и комбинированными растворами (группа 2) (M ± S, $n = 5$; контроль – показатели функциональных свойств тромбоцитов, выделенных из донорской крови методом из лейкотромбоцитарного слоя, принятые за 100%; □ – АДФ-агрегация; ▨ – коллаген-агрегация; ■ – РГШ; ⊟ – ретракция; * – отличия статистически достоверны по сравнению с показателем для 10% ДМСО; # – отличия статистически достоверны по сравнению с показателем для соответствующего 10% раствора криопротектора, $p < 0,05$).

Таким образом, экспериментально показана целесообразность создания криоконсервантов для замораживания тромбоцитов на основе использования в растворе комбинации двух криопротекторов, относящихся к разным классам химических соединений – амидов и полиолов. Такой подход позволяет применять эффективную для криозащиты суммарную концентрацию криопротекторов в криоконсерванте без увеличения цитотоксического действия, что рассматривается как один из факторов существенного повышения результатов криоконсервирования тромбоцитов [3, 9, 28, 35, 36].

Кроме того, появляется все больше работ с описанием эффекта «нейтрализации токсичности криопротекторов», в том числе за счет разных комбинаций криозащитных соединений [39].

Имеется достаточно убедительных доказательств того, что криопротекторы способны индуцировать криоповреждения биологического материала на этапе замораживания-отогрева («cryoprotectant-associated freezing injury») [38]. Так, G.M. Fahy и A.M. Karrow [37], а затем G.M. Fahy, в своей диссертационной работе (цитируется по [39]) ещё в 1977 году высказали предположение, что степень повреждения после замораживания и отогрева в ряде случаев коррелирует не с количеством образовавшегося льда и не с токсическим действием электролитов, а с концентрацией криопротектора на этапах замораживания-отогрева, подчеркнув, что криопротекторы могут оказывать повреждающее действие при их концентрировании в ходе вымораживания воды. Позднее F.G. Arnaud и D.E. Pegg [30] объясняли полученный в их работах низкий уровень сохранности КТ после криоконсервирования с 1,2-ПД повышением его концентрации в процессе замораживания воды до значений, которые оказывают повреждающее действие на тромбоциты, вызывают деполимеризацию актиновых волокон.

К положительным свойствам исследованных комбинированных криоконсервантов следует также отнести выявленное нами уменьшение величины начального переохлаждения среды – фактора, оказывающего повреждающее действие на тромбоциты при замораживании [9, 26]. Установлено, что использование комбинированных криоконсервантов приводит к уменьшению величины переохлаждения образца в момент кристаллизации по сравнению с результатами применения растворов отдельных криопротекторов [4].

Следует отметить, что при анализе результатов криоконсервирования КТ с комбинированными криоконсервантами возникают вопросы: почему эффективным было лишь сочетание ДМАЦ с 1,2-ПД, глицерином и особенно $ОЭГ_{n=5}$; почему растворы, содержащие комбинацию 1,2-ПД с глицерином или $ОЭГ_{n=5}$, оказались малоэффективными в качестве криозащитных сред, хотя и не оказывали неблагоприятное цитотоксическое действие на тромбоциты на этапе экспозиции?

По-видимому, для тромбоцитов более эффективно использование в криозащитных средах комбинации криопротекторов, которые относятся к разным классам химических соединений, отличаю-

щихся структурой и физико-химическими свойствами, механизмом криозащитного действия.

Так, физико-химические свойства исследованных криопротекторов, характеризующие способность к гидрофильным (плотность, вязкость) и гидрофобным (поверхностное натяжение, поверхностная активность) взаимодействиям, указывают на то, что механизм криозащитного действия $ОЭГ_{n=5}$ и глицерина может быть обусловлен их высокой гидрофильностью. ДМАЦ и 1,2-ПД также относятся к высокогидрофильным веществам, способным к образованию сильных водородных связей с молекулами воды, однако наличие в молекулах этих соединений алкильных групп указывает на их гидрофобность. Особо следует подчеркнуть способность к сильным гидрофильным и одновременно гидрофобным взаимодействиям у дизамещенного амида ДМАЦ. Предполагается, что в механизм криозащитного действия растворов, содержащих комбинацию ДМАЦ с полиолами глицерином, $ОЭГ_{n=5}$, 1,2-ПД, существенный вклад вносит именно гидрофобность (мембранотропность) амида.

Как считает P. Mazur [45], основные вопросы относительно механизма криозащитного действия криопротекторов до настоящего времени не решены. Не получен ответ на вопрос, что является основой криозащитного эффекта – физико-химические и коллигативные свойства веществ или их специфическое, обусловленное химическими свойствами, действие на мембраны клеток, свойства внутри- и внеклеточных растворов, цитозоля. По-видимому, существуют какие-то ещё не до конца установленные факторы криозащиты. Вполне вероятно, что криопротекторы отличаются механизмом криозащитного действия и их сочетание в криозащитном растворе дополняет, а возможно, и усиливает эффективность криопротекции.

Высказанные выше предположения подкрепляются результатами, полученными в экспериментах на других биологических объектах.

Так, в исследованиях, проведенных Институтом животноводства УААН с нашим участием [24] по изучению защитного действия криопротекторов ряда амидов и глицерина при замораживании

спермиев жеребцов, также установлена высокая криозащитная эффективность растворов, содержащих комбинации амидов диметилформамида (ДМФА) или ДМАЦ с глицерином. В частности, показана возможность использования при замораживании спермиев жеребца как глицерина, так и криопротекторов ДМАЦ и ДМФА с высоким криозащитным эффектом по показателям подвижности, выживаемости и степени повреждения мембранного аппарата гамет. Однако комбинация в криозащитном растворе глицерина с одним из криопротекторов ряда амидов (ДМАЦ или ДМФА) способствовала повышению уровня сохранности криоконсервированных спермиев, увеличению их подвижности в среднем на 8–12% и достоверному уменьшению количества гамет с разрушенным мембранным аппаратом (категория «мертвые») на 12% ($p < 0,05$).

Отдельного внимания заслуживают данные об использовании криозащитных растворов, содержащих комбинацию проникающих и непроникающих криопротекторов, при замораживании эритроцитов человека.

К преимуществам криоконсервирования эритроцитов с непроникающими (экстрацеллюлярными) криопротекторами относят возможность исключения этапа их отмывания перед трансфузией. Однако общими недостатками экстрацеллюлярных соединений являются опасность значительной (до 50%) дегидратации клеток на этапах криоконсервирования, структурная нестабильность замороженных эритроцитов после отогрева и их низкая осмотическая устойчивость [14, 15, 51].

В отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины путем оксиэтилирования многоатомных спиртов, в частности глицерина, созданы оригинальные криопротекторы с экстрацеллюлярным механизмом действия – олигомеры ОЭГ [25]. Показана перспективность использования $ОЭГ_{n=25}$ и $ОЭГ_{n=30}$ в качестве непроникающих криопротекторов для криоконсервирования эритроцитов человека, однако показатели их осмотической устойчивости после замораживания-отогрева были недостаточно высоки [11, 19]. В этой связи нами проведена модификация криозащитных растворов на основе непроникающего $ОЭГ_{n=25}$ введением в их состав

проникающих криопротекторов, относящихся к ряду диолов (1,2-ПД), амидов (ДМАЦ) и сульфоксидов (ДМСО). Учитывая различия в структуре, физико-химических свойствах, скорости и механизмах проникновения этих низкомолекулярных соединений через клеточную мембрану, можно предположить, что комбинированные криозащитные среды будут по-разному влиять на процесс термодинамического равновесия в системе «клетка-криопротектор» как на этапе экспозиции до замораживания, так и на этапе перенесения эритроцитов в изоосмотическую среду.

Исследована криозащитная эффективность растворов, содержащих различные комбинации $ОЭГ_{n=25}$ с 1,2-ПД, ДМАЦ и ДМСО в соотношениях 5:1, 2:1 и 1:1 в 30%-й суммарной (общей) концентрации по сравнению с растворами, содержащими только $ОЭГ_{n=25}$ в концентрации 30%. Одним из главных критериев эффективности комбинированных криозащитных сред были показатели осмотической хрупкости криоконсервированных эритроцитов. Концентрация $ОЭГ_{n=25}$ 30% была выбрана как наиболее эффективная, позволяющая достичь высокого уровня сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева. Кроме 30%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$, использовали криозащитные среды, содержащие 25, 20 и 15%-е концентрации $ОЭГ_{n=25}$ без добавления проникающих криопротекторов (табл. 1).

При исследовании эффективности замораживания эритроцитов в комбинированных криозащитных средах получены неоднозначные результаты.

Наиболее низкие показатели гемолиза криоконсервированных эритроцитов получены после их замораживания-отогрева в криозащитных средах, содержащих комбинации $ОЭГ_{n=25}$ и 1,2-ПД в соотношении 5:1 и 2:1, $ОЭГ_{n=25}$ и ДМАЦ в соотношении 5:1; 2:1 и 1:1, а также в 30%-м растворе $ОЭГ_{n=25}$ (рис. 4). Можно предположить, что отсутствие значимых отличий в сохранности замороженных эритроцитов по показателю гемолиза между комбинированными средами и 30%-м $ОЭГ_{n=25}$ обусловлено высокой криозащитной активностью базового раствора непроникающего криопротектора.

Замораживание-отогрев эритроцитов в криозащитных средах, содержащих комбинацию $ОЭГ_{n=25}$ и 1,2-ПД в соотношении 2:1 и 1:1

Таблица 1.Зависимость сохранности эритроцитов от концентрации $ОЭГ_{n=25}$ в криозащитном растворе после замораживания-отогрева (M ± S, n = 5)

Концентрация $ОЭГ_{n=25}$ в растворе, %	Осмотическая хрупкость, %		Свободный гемоглобин, г/л	Гемолиз, %	Гематокрит, %	
	0,6% NaCl	0,9% NaCl			до замораживания	после замораживания-отогрева
Контроль (0)	2,0±0,04	0,76±0,42	0,03±0,01	0,02±0,01	37,4±2,19	–
15	61,4±1,16*	55,0±1,18*	17,8±0,9	18,2±0,94*	24,9±0,51*	21,3±0,78*
20	30,8±1,07*	28,3±1,32*	5,0±0,91	3,6±0,86*	24,05±0,77*	23,4±0,87*
25	26,6±0,57*	23,2±1,01*	1,4±0,28	1,4±0,13*	22,1±0,63*	20,3±1,10*
30	11,7±2,57*	10,5±1,9*	0,96±0,52	1,3±0,32*	24,2±0,80*	21,8±1,85*
40	40,0±3,77*	24,4±1,08*	–	3,7±0,36*	23,7±0,57*	21,08±1,7*

Примечание: * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

(20%-й $ОЭГ_{n=25}$/10%-й 1,2ПД и 15%-й $ОЭГ_{n=25}$/15%-й 1,2-ПД), приводило к достоверному увеличению уровня свободного гемоглобина в надосадке по сравнению с 30%-м раствором $ОЭГ_{n=25}$: с 0,96 ± 0,52 до 2,6 ± 0,64 и 4,2 ± 1,31 г/л соответственно. После криоконсервирования эритроцитов с остальными изученными комбинированными средами достоверных отличий по данному показателю с базовым контролем (30%-й $ОЭГ_{n=25}$) не выявлено, хотя количество свободного гемоглобина в надосадке было высоким, особенно для сред с соотношением криопротекторов 1:1.

Криоконсервирование эритроцитов в комбинированных криозащитных средах сопровождалось увеличением показателя гематокрита до и после замораживания-отогрева, что косвенно свидетельствует об уменьшении степени дегидратации (обезвоживания) клеток. Однако существенной зависимости величины этого показателя от состава криозащитных сред, а также корреляции

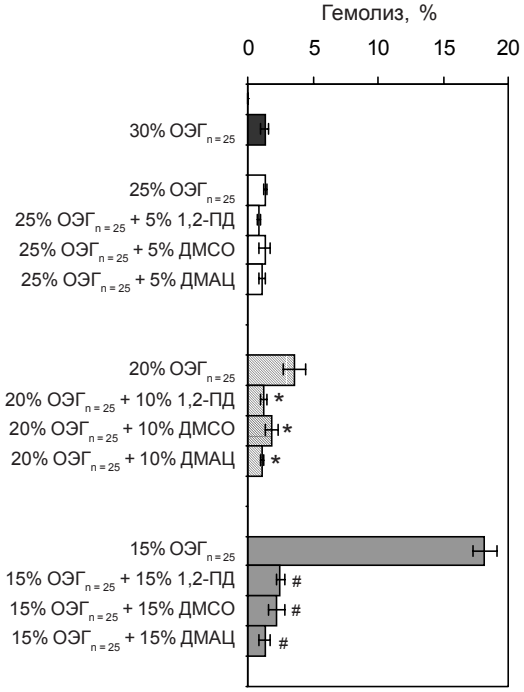


Рис. 4. Уровень гемолиза эритроцитов после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов (* – отличия статистически достоверны по сравнению с 20% $ОЭГ_{n=25}$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с 15% $ОЭГ_{n=25}$, $p \leq 0{,}05$).

между его величиной и сохранностью криоконсервированных эритроцитов установлено не было.

Особый интерес вызывают данные, полученные при исследовании осмотической хрупкости криоконсервированных эритроцитов (рис. 5).

Сочетание в криозащитных средах $ОЭГ_{n=25}$ с 1,2-ПД, ДМСО или ДМАЦ в соотношении 5:1 позволяет достоверно снижать осмотическую хрупкость размороженных эритроцитов (рис. 5). Так, наиболее высокой осмотической устойчивостью по сравнению с данными для 25%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$ характеризовались эритроциты, замороженные в растворах, содержащих комбинацию 25% $ОЭГ_{n=25}$ с 5% ДМАЦ, а также 25% $ОЭГ_{n=25}$ с 5% 1,2-ПД или ДМСО.

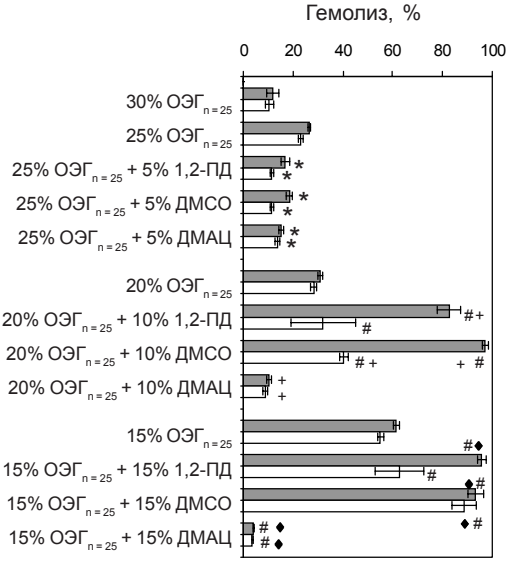


Рис. 5. Осмотическая хрупкость эритроцитов после замораживания-отогрева в растворах, содержащих комбинации криопротекторов (■ – 0,6%-й раствор NaCl, □ – 0,9%-й раствор NaCl; отличия статистически достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с данными для растворов $ОЭГ_{n = 25}$ с концентрацией: * – 25%; + – 20%; ♦ – 15%; # – 30%.

После замораживания-отогрева эритроцитов в средах, содержащих комбинацию $ОЭГ_{n = 25}$ с 1,2-ПД или ДМСО в соотношении 2:1 или 1:1, отмечено резкое увеличение их осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl по сравнению с 30% $ОЭГ_{n = 25}$ (рис. 5). И лишь использование в составе криозащитных растворов комбинации $ОЭГ_{n = 25}$ и ДМАЦ в соотношении 2:1 и 1:1 позволило значительно увеличить сохранность эритроцитов по данному показателю. Наиболее устойчивыми к осмотическим воздействиям оказались эритроциты, криоконсервированные в растворе, содержащем 15% $ОЭГ_{n = 25}$ и 15% ДМАЦ. Осмотическая хрупкость этих эритроцитов в 0,9 и 0,6%-х растворах NaCl была предельно низкой и составила $3,6 \pm 0,23$ и $4,1 \pm 0,18$% соответственно, т. е. использование комбинации $ОЭГ_{n = 25}$ и ДМАЦ (1:1) способствовало снижению осмотической хрупкости размороженных эритроцитов более чем в 10 раз по сравнению с 15% $ОЭГ_{n = 25}$ и более чем в 3 раза – по сравнению с 30%-м раствором $ОЭГ_{n = 25}$.

Было проведено сравнительное изучение осмотической устойчивости криоконсервированных эритроцитов в гипотонических растворах NaCl (рис. 6). Установлено, что в 0,5–0,1%-х растворах NaCl показатели осмотической хрупкости были несколько выше у эритроцитов, замороженных в 30%-м растворе $ОЭГ_{n=25}$, тогда как в 0,7 и 0,9 %-х растворах NaCl значительно более устойчивыми были эритроциты, замороженные с комбинированным раствором, содержащим 15% $ОЭГ_{n=25}$ и 15% ДМАЦ.

Таким образом, введение в комбинированные криозащитные среды на основе $ОЭГ_{n=25}$ низкомолекулярных 1,2-ПД или ДМСО в 10 или 15%-й концентрации вызывало резкое увеличение осмотической хрупкости размороженных эритроцитов. Вероятно, данный эффект может быть следствием как прямого воздействия химических веществ, в частности, ДМСО, на клеточную мембрану (токсичность), так и результатом осмотических эффектов комбинированных растворов. Ранее было показано [40, 50], что повреждающее действие ДМСО в процессе замораживания-отогрева может быть обусловлено деструктуризацией липидного бислоя за счет гидрофобных взаимодействий метильной группы ДМСО с углеводородными компонентами фосфолипидов. Так, ДМСО в концентрациях от 2,5 до 7,5 моль% вызывает истончение мембраны и увеличивает текучесть её гидрофобных компонентов [40]; повышение концентрации ДМСО до 10–20 моль% способно инициировать образование транзиторных водных пор в мембранах; дальнейшее повышение концентрации (30 моль% и более) вызывает структурную дезинтеграцию бислоя [40, 50].

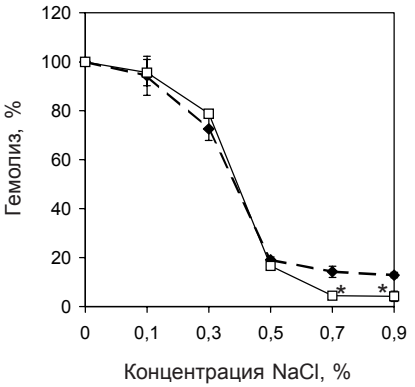


Рис. 6. Осмотическая хрупкость эритроцитов в гипотонических растворах NaCl (◆ – 30% $ОЭГ_{n=25}$; □ – 15% $ОЭГ_{n=25}$ + 15% ДМАЦ; * – отличия статистически достоверны по сравнению с 30% $ОЭГ_{n=25}$, $p \le 0,05$).

Отсутствие эффекта от использования в комбинированных растворах 10 и 15%-х концентраций 1,2-ПД может объясняться тем, что этот криопротектор снижает вязкость фосфолипидного бислоя мембран эритроцитов и вызывает дезагрегацию их белковых комплексов, что также может приводить к нарушению структуры эритроцитарных мембран [13].

Известно, что ДМАЦ характеризуется более высокой способностью к гидрофобным взаимодействиям по сравнению с 1,2-ПД и ДМСО [6]. По-видимому, наблюдаемое положительное влияние ДМАЦ в составе комбинированных криозащитных сред на осмотическую устойчивость эритроцитов связано с его способностью взаимодействовать с липидными компонентами мембран, в результате чего площадь поверхности плазматической мембраны может увеличиваться, а соотношение объем клетки/площадь поверхности мембраны – уменьшаться, что снижает опасность развития коллоидно-осмотического лизиса. Если оценивать эффективность использования ДМСО, 1,2-ПД или ДМАЦ в комбинации с $ОЭГ_{n=25}$ с точки зрения их положительного влияния на сохранность замороженных эритроцитов по сравнению с действием 30, 25, 20 и 15%-х растворов $ОЭГ_{n=25}$, то очевидно, что по показателям осмотической хрупкости эритроцитов наиболее эффективным криопротектором в составе комбинированного криоконсерванта является ДМАЦ в концентрации 10 или 15%.

Известно, что эритроциты, криоконсервированные под защитой непроникающих криопротекторов, характеризуются достаточно высокой (90–98%) сохранностью сразу после отогрева [1, 14, 49]. Вместе с тем криоконсервирование эритроцитов в растворах непроникающих криопротекторов может приводить к развитию латентных повреждений их мембран, которые проявляются, прежде всего, изменением липидной асимметрии и модификацией цитоскелет-мембранного комплекса клеток [48]. Возможные пути предотвращения латентных повреждений до настоящего времени исследованы недостаточно. По мнению D.V. Pribor [41] латентные повреждения эритроцитов не обнаруживаются сразу после отогрева, а проявляются лишь в снижении их осмотической устойчивости и нарастании гемолиза в процессе последующего гипотермического хранения.

Принимая во внимание этот факт, мы исследовали сохранность эритроцитов, криоконсервированных в 30%-м растворе ОЭГ$_{n=25}$ и комбинированном растворе 15% ОЭГ$_{n=25}$ + 15% ДМАЦ и взвешенных после отогрева в плазмозамещающем растворе ЦОЛИПК-8в, в процессе их гипотермического хранения (4 ± 2°С) в течение 1, 24 и 48 ч. После 1 и 24 ч гипотермического хранения суспензии криоконсервированных эритроцитов уровни гемолиза и свободного гемоглобина были значительно ниже в образцах, криоконсервированных в 30%-м растворе ОЭГ$_{n=25}$, по сравнению с образцами эритроцитов, замороженных в комбинированном растворе 15% ОЭГ$_{n=25}$ + 15% ДМАЦ (табл. 2). С увеличением времени хранения криоконсервированных эритроцитов до 48 ч уровень их

Таблица 2. Сохранность размороженных эритроцитов, криоконсервированных в 30%-м растворе ОЭГ$_{n=25}$ и 15% ОЭГ$_{n=25}$ + 15% ДМАЦ, в процессе гипотермического хранения в среде ЦОЛИПК-8в при температуре 4 ± 2°С (M ± S, n = 5)

Срок хранения, ч	Раствор	Осмотическая хрупкость, %		Гемолиз, %	Свободный гемоглобин, г/л	Гематокрит, %
		0,6% NaCl	0,9% NaCl			
1	30% ОЭГ$_{n=25}$	4,5 ± 0,55	1,8 ± 0,26	1,6 ± 0,32	0,83 ± 0,2	28,6 ± 0,63
	15% ОЭГ$_{n=25}$ + 15% ДМАЦ	1,8 ± 0,26*	0,7 ± 0,25*	5,2 ± 1,1*	2,3 ± 0,76*	27,7 ± 0,4
24	30% ОЭГn = 25	6,9 ± 0,25	7,22 ± 0,59	1,8 ± 0,28	0,87 ± 0,19	28,2 ± 0,51
	15% ОЭГ$_{n=25}$ + 15% ДМАЦ	4,7 ± 1,15*	1,5 ± 0,6*	5,3 ± 1,88*	2,5 ± 0,64*	27,9 ± 1,11
48	30% ОЭГ$_{n=25}$	5,35 ± 0,5	6 ± 0,08	1,2 ± 0,53	1,8 ± 0,23	23,2 ± 0,98
	15% ОЭГ$_{n=25}$ + 15%ДМАЦ	1,1 ± 0,27*	1,1 ± 0,39*	1,8 ± 0,62	2,87 ± 0,25	25,9 ± 1,3

Примечание: * – отличия статистически достоверны по сравнению с данными для 30%-го раствора ОЭГ$_{n=25}$, $p \leq 0,05$.

гемолиза снижался как для комбинированного раствора, так и для 30%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$. Изменение содержания свободного гемоглобина в образцах, а также величины гематокрита после 48 ч гипотермического хранения было более значительным для эритроцитов, замороженных с 30%-м $ОЭГ_{n=25}$.

Наиболее высокий уровень сохранности криоконсервированных эритроцитов по показателю их осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl в течение 48-часового гипотермического хранения установлен для криозащитной среды, содержащей комбинацию 15% $ОЭГ_{n=25}$ + 5% ДМАЦ (табл. 2). После гипотермического хранения суспензии эритроцитов, криоконсервированных в 30%-м растворе $ОЭГ_{n=25}$, наблюдалось достоверное увеличение показателя осмотической хрупкости по сравнению с комбинированным раствором.

Таким образом, результаты экспериментов по хранению эритроцитов, криоконсервированных с непроникающим криопротектором $ОЭГ_{n=25}$ в составе комбинированного или однокомпонентного раствора и взвешенных после отогрева в плазмозамещающем растворе, в течение 48 ч в условиях гипотермии ($4 \pm 2°C$) показали отсутствие существенных потерь клеток (показатель гематокрита), а также значительного увеличения показателей гемолиза, свободного гемоглобина и осмотической хрупкости. Следует подчеркнуть, что полученные данные можно трактовать как подтверждение целесообразности применения в качестве непроникающего криопротектора для замораживания эритроцитов $ОЭГ_{n=25}$, а также дальнейших исследований по созданию комбинированных криоконсервантов на его основе.

Высокая эффективность использования смеси (комбинаций) криопротекторов в криозащитных средах установлена также при замораживании меристем растений.

С целью сохранения генетических ресурсов растений в ИПКиК НАН Украины в настоящее время проводятся работы по созданию методов криоконсервирования меристем винограда и чеснока [29]. Исследования, направленные на разработку состава криозащитной среды для замораживания меристем винограда, показали, что комбинация в составе криозащитных сред двух криопротекторов более эффективна, чем использование этих же криопротекторов в отдельности.

Проведено сравнительное изучение эффективности криозащитных сред, в состав которых входят криопротекторы 1,2-ПД, ПВП, а также этиленгликоль и ПВП. Наиболее эффективной оказалась комбинация раствора 1 М 1,2-ПД и 7% ПВП: сохранность меристем винограда после замораживания-отогрева с этой криозащитной средой составила 80%, тогда как в случае использования растворов криопротекторов 1,2-ПД или ПВП в отдельности показатели сохранности были 45 и 10% соответственно. Под сохранностью меристем понимали количество образцов с тенденцией к росту после замораживания-отогрева по отношению к общему количеству образцов.

При разработке методов криоконсервирования меристем чеснока (*Allium sativum*) исследовали эффективность криозащитных сред, в состав которых входили комбинации двух или трех криопротекторов: 1,2-ПД и ПВП, метилацетамид и полиэтиленоксид с м. м. 6000, а также 1,2-ПД, метилацетамид и ПВП. Анализ полученных данных показал, что наиболее высокий уровень сохранности криоконсервированных меристем чеснока был получен при использовании 3-компонентной комбинированной криозащитной среды, содержащей 1 М 1,2-ПД, 0,5 М метилацетамида и 3,5% ПВП.

Известно, что на всех этапах криоконсервирования клеток и тканей происходит резкое повышение уровня свободнорадикального окисления липидов мембран, что может привести к повреждению их структуры и нарушению физиологических функций. Коррекция уровня свободнорадикального окисления может осуществляться как введением в криозащитную среду истинных антиоксидантов, так и совместным действием криопротекторов при условии соблюдения оптимальных режимов криоконсервирования.

Актуальность исследования взаимосвязи между прооксидантно-антиоксидантным балансом мембран клеток и их сохранностью, функциональной активностью после криоконсервирования с комбинированными криоконсервантами определяется недостаточной изученностью вклада свободнорадикального окисления в метаболические процессы в целом. И если раньше изменения прооксидантно-антиоксидантного равновесия считали исключительно негативным фактором, в том числе и патогенетическим фактором инициации многих заболеваний, то в современной научной

литературе появляются сведения о важном регуляторном значении метаболитов переокисления ненасыщенных жирных кислот в жизнедеятельности как отдельной клетки, так и целого организма [16].

После того, как факт «оксидативного взрыва» в мембранах замороженных-отогретых клеток стал общепризнанным, предпринимались многочисленные попытки нивелировать его путем введения в криозащитную среду природных и синтетических антиоксидантов. Параллельно изучалось антиоксидантное действие ряда классических криопротекторов на различные биологические объекты. Хотя определенные успехи в данных исследованиях были достигнуты, вопрос о механизмах антиоксидантного действия криопротекторов остается открытым.

В отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины проводились исследования антиоксидантных свойств криопротекторов различных классов химических соединений. На начальных этапах в модельных системах изучали способность $ОЭГ_{n=5}$, $ОЭГ_{n=25}$, $ОЭГ_{n=30}$, 1,2-ПД, ДМАЦ, диметилформамида, глицерина к перехвату супероксидного радикала и общей антиоксидантной активности.

Антиоксидантную активность исследованных веществ оценивали по концентрациям, при которых достигается 50%-е ингибирование реакции относительно контроля (IC_{50}, мМ). Результаты, полученные на модельных системах, показали, что ни одно из изученных веществ не обладало существенной антиоксидантной активностью в системе желточных липопротеидов [20]. Способность всех криопротекторов к перехвату супероксид-радикала не превышала 30%. Наряду с этим была выявлена высокая способность криопротекторов к перехвату гидроксильного радикала. По возрастанию эффективности данного показателя они располагаются следующим образом: глицерин < диметилформамид <ДМАЦ < ДМСО < 1,2-ПД < $ОЭГ_{n=5}$ < $ОЭГ_{n=25}$ < $ОЭГ_{n=30}$. Значения IC_{50} составляли 5,43; 3,42; 2,87; 0,82; 0,82; 0,42; 0,18 мМ соответственно [7, 20].

По нашим представлениям, способность к перехвату гидроксильного радикала определяется образованием перекисей в месте локализации гидроксильных и простых эфирных групп в молекулах полиолов и их оксиэтильных производных с последующим образованием собственных короткоживущих радикалов. Инакти-

вация гидроксильного радикала, по-видимому, происходит по пути реакции рекомбинации. Наличие корреляции между степенью полимеризации ОЭГ и значениями IC_{50} объясняется количеством вышеупомянутых групп. Различия антирадикальной активности между веществами, принадлежащими к различным классам соединений, обусловлены их химической структурой. Степень окисляемости эфирной, спиртовой и карбонильной групп зависит от их энергии связи (75, 110 и 150 ккал соответственно), стерических препятствий, индукционного эффекта заместителей и уменьшается согласно вышеприведенному ряду.

Таким образом, антирадикальная активность исследованных криопротекторов в модельных системах определяется их химической структурой, количеством, природой и окислительной активностью входящих в них группировок. Однако в биологических объектах антиоксидантные свойства данных веществ проявляются несколько иначе [9, 20].

Эксперименты по изучению влияния криопротекторов на прооксидантно-антиоксидантный статус клеток крови (тромбоцитов) человека до и после низкотемпературного консервирования в жидком азоте показали, что введение ДМСО, глицерина и $ОЭГ_{n=5}$ приводит к повышению содержания активных продуктов тиобарбитуровой кислоты, тогда как 1,2-ПД, ДМАЦ, диметилформамид существенно не влияют на данный баланс тромбоцитов. Поэтому можно утверждать, что отсутствие корреляции между показателями интенсивности свободнорадикального окисления ненасыщенных жирных кислот мембран тромбоцитов и исследованными антиоксидантными свойствами криопротекторов определяются не только их способностью к перехвату гидроксильных радикалов. Анализ и сопоставление полученных данных с уровнем сохранности клеток на этапах криоконсервирования позволяют высказать предположение о недостаточном антиоксидантном защитном эффекте вышеперечисленных криопротекторов при их использовании в виде монорастворов [7, 9].

Измерение интенсивности свободнорадикального окисления мембран криоконсервированных тромбоцитов может свидетельствовать о мембраноструктурирующем действии криозащитных растворов, содержащих комбинацию ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/

$ОЭГ_{n=5}$ и ДМАЦ/глицерин, на что указывает более низкое содержание вторичных (гидроперекиси липидов) и конечных (основания Шиффа) продуктов переокисления ненасыщенных жирных кислот (рис. 7, А) по сравнению с данными для 10%-го раствора ДМСО.

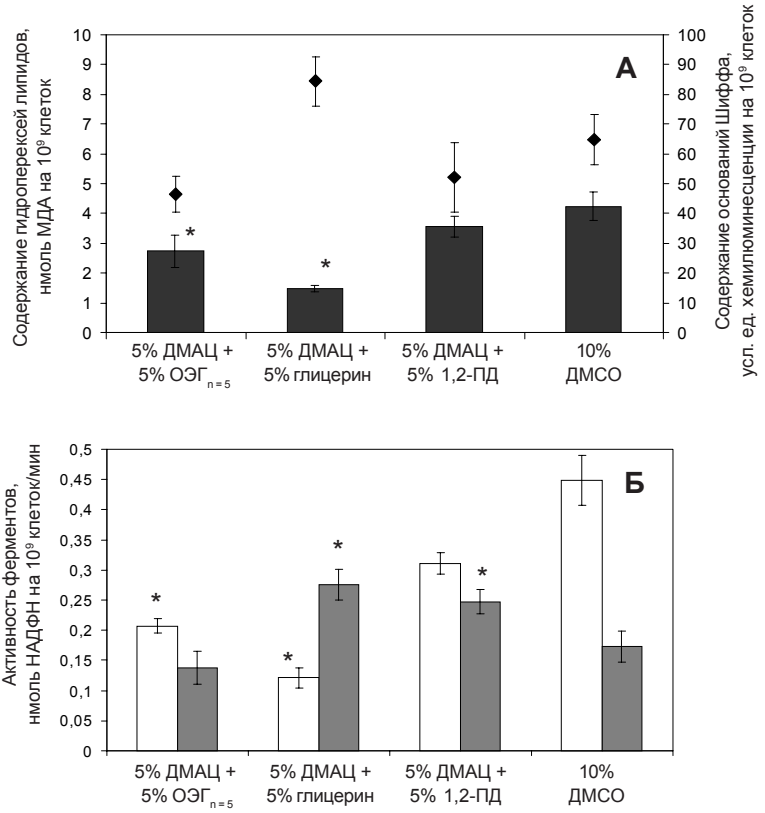


Рис. 7. Содержание продуктов перекисного окисления липидов (А) и активность ферментов (Б) в криоконсервированных тромбоцитах (M ± S, n = 5; А: ■ – гидроперекиси липидов; ◆ – основания Шиффа; Б: □ – глутатионредуктазная активность; ▨ – глутатионпероксидазная активность; А и Б: * – отличия статистически достоверны по сравнению с показателем для 5% ДМСО, $p < 0,05$; данные для ДМСО получены при охлаждении суспензии тромбоцитов в программном замораживателе с оптимальной скоростью).

Предполагается, что относительно стабильный уровень свободнорадикального окисления в значительной мере обеспечивается сбалансированной работой антиоксидантных ферментов глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы (рис. 7, Б). По-видимому, в процессе криоконсервирования тромбоцитов с ДМСО происходит более значительное снижение устойчивости их мембран к окислительному стрессу по сравнению с применением комбинированных криоконсервантов.

Экспериментальные данные, полученные в последние годы, позволяют наметить перспективные направления дальнейших исследований по созданию эффективных криоконсервантов, одно из которых – использование комбинаций криопротекторов в криозащитных средах, что повысит сохранность разных биологических объектов (клетки крови, спермии животных, меристема растений) после криоконсервирования.

Литература

1. Бабийчук Л.А. Конформационные изменения эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 1997. – №1–2. – С. 95–99.
2. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. думка, 1982. – 255 с.
3. Богданчикова О.А., Компаниец А.М. Криоконсервирование тромбоцитов. 1. Разработка криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов и исследование их эффективности // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №3. – С. 324–337.
4. Богданчикова О.А., Киреев В.А., Ходько А.Т., Компаниец А.М. Криоконсервирование тромбоцитов. 2. Эффективность криоконсервантов на основе комбинаций криопротекторов при различных режимах замораживания // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 343–451.
5. Воробьева Г.С., Компаниец А.М., Ивашков В.И. Разработка метода криоконсервирования тромбоцитов с ДМАЦ для клинических целей // Консервирование крови и ее компонентов / Под ред. О.К. Гаврилова, В.А. Аграненко. – М., 1981. – С. 77–78.
6. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Проблемы криобиологии. – 2002. – №4. – С. 9–15
7. Книш О.В., Овсянніков С.Є., Нікітченко Ю.В., Компанієць А.М. Дослідження антирадикальних властивостей кріопротекторів та їх впливу на інтенсивність ПОЛ у системі «тромбоцити-плазма» // Медична хімія.– 2006. –Т. 8, №3. – С. 25–28.
8. Компаниец А.М. Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность: Автореф. дис. … докт. мед. наук. – Москва, 1992. – 52 с.
9. Компанієць А.М., Книш О.В., Гуріна Т.М. та ін. Дослідження морфофункціональної збереженості тромбоцитів на етапах кріоконсервування // Проблемы криобиологии. – 2006.– Т. 6, №2. – С. 182–191.
10. Компаниец А.М., Линник Т.П., Николенко А.В. и др. Криопротекторные свойства соединений ряда амидов при замораживании тромбоцитов // Деп. В ВИНИТИ №2111 от 26.03.1985. – 8 с.

11. Компаниец А.М., Николенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П. Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3.– С. 561– 565.
12. Ліннік Т.П. Фізико-хімічні фактори кріопошкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. … докт. біол. наук. – Харків, 2003. – 36 с.
13. Лоевский М.М. Влияние глицерина (пропантриола) и 1,2-пропандиола на структурно-функциональные характеристики криоконсервированных эритроцитов : Автореф. дис. … канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 21 с.
14. Мартыненко А.А., Луговой В.И. Влияние ПЭО-1500 и низких температур на изоосмотическую резистентность эритроцитов человека // Криобиология и криомедицина. – 1989. – Вып. 8. – С. 13–16.
15. Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О. А. Дегидратация эритроцитов компонентами криоконсервирующих сред // Криобиология и криомедицина. – 1989. – №2. – С. 13–16.
16. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: «Слово», 2006. – 556 с.
17. Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. Условия витрификации эмбрионов вьюна (Misgurnus fossilis) в криозащитных средах // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С.154–162.
18. Николенко А.В., Луговой В.И., Компаниец А.М. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов // Проблемы криобиологии. – 1996. – №4. – С. 36–40.
19. Ніколенко О.В., Єсіпова Ю.С., Компанієць А.М. Кріоконсервування еритроцитів людини під захистом полімер гомологу оксиетильованого гліцерину ($ОЕГ_{n=30}$) // Гематологія і переливання крові. – 2008. – Вип. 34, Т. 2. – С. 166–170.
20. Овсянников С.Е., Кныш О.В., Линник Т.П., Компаниец А.М. Зависимость антирадикальной активности криопротекторов ряда полиолов и их оксиэтильных производных от химической структуры // Зб. матеріалів IX Укр. біохімічного з'їзду.– Харків, 2006. – Т. 1. – С. 156–157.
21. Петренко Ю.А. Криоконсервирование клеток эмбриональной печени человека с использованием ДМСО и высокомолекулярных полимеров // Проблемы криобиологии. – 2003.– Т. 13, №1. – С. 80–88.
22. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №1. – С. 47–57.
23. Скопина С.Б., Виноград-Финкель Ф.Р., Полушина Т.В. и др. Изыскание эффективных ограждающих растворов для криоконсервирования тромбоцитов // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1975. – Т. 20, №9. – С. 17–21.
24. Сушко О.Б., Міщенко А.Г., Компанієць А.М. та ін. Ефективність застосування буферних середовищ, кріопротекторів і режимів заморожування сперми жеребців // Вісник аграрної науки. – 2009. – №9. – С. 35–39.
25. Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В. Некоторые принципы направленного синтеза криопротекторов // Актуальные проблемы криобиологии. – К.: Наук. думка, 1981. – С. 157–200.
26. Пат. 3664 Україна, МПК5 А61К35/14. Спосіб консервування тромбоцитів / А.М. Компанієць, О.В. Ніколенко, С.Т. Олійник та ін.; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – №4680905/30–14; заявл. 22.03.93; опубл. 27.12.94, Бюл. №6.
27. Пат. 15014 Україна, МПК8 A0N1/02. Спосіб видалення кріопротектора із суспензії тромбоцитів / В.І. Грищенко, А.М. Компанієць, О.В. Книш; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – №U200510926; заяв. 18.11.2005; опубл. 15.06.2006, Бюл. №6.
28. Пат. 84775 Україна, МПК6 AO1N1/02. Спосіб кріоконсервування концентрату тромбоцитів людини / В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна, О.В. Книш, А.М. Компанієць; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – №U200510926; заявл. 05.01.2007; опубл. 25.11.2008, Бюл. №22.

29. Пат. №22540, Україна МПК6 A01N3/00. Спосіб кріоконсервування методом вітрифікації меристем часнику сорту «Мереф'янський білий» / Т.Ф. Стрибуль, Н.О. Шевченко, Т.І. Івченко та ін.; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – №U200612465; заяв. 27.11.2006; опубл. 25.04.2007, Бюл. №5.
30. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol // Cryobiology. – 1990.– Vol. 27, №2. – P. 130–136.
31. Balint B., Vucetic D., Trajkovic–Lakic Z. et al. Quantitative, functional, morphological and ultrastructural recovery of platelets as predictor for cryopreservation // Haematologia (Budap). – 2002. – Vol. 32, №4. – P. 363–375.
32. Borzini P., Assali G., Riva M.R. et al. Platelet cryopreservation using dimethylsulfoxide/polyethylene glycol/sugar mixture as cryopreserving solution // Vox Sang. – 1993. – Vol. 64, №4. – P. 248–249.
33. Borzini P., Lazzaro A., Mazzucco L. et al. Platelet cryopreservation using second–messenger effectors and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide. In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer // Haematologica. – 2000. – Vol. 85, №8. – P. 885–887.
34. Clapisson G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone // Bull. Cancer.– 2004. – Vol. 91, №4. – P. 711–718.
35. Currie L.M., Livesey S.A., Harper J.R., Connor J. Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of in vitro functional activity // Transfusion. – 1998. – Vol. 38, №2. – P. 160–167.
36. Dijkstra-Tiekstra M.J., de Korte D., Pietersz R.N.I. et al. Comparison of various dimethylsulphoxide-containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates // Vox Sang. – 2003. – Vol. 85, №4. – P. 276–282.
37. Fahy G.M., Karrow A.M. Ultrastructure-function correlative studies for cardiac cryopreservation. V. Absence of correlation between electrolyte toxicity and cryoinjury in the slowly frozen, cryoprotected rat heart // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, №3. – P. 418–427.
38. Fahy G.M. The relevance of cryoprotectant «toxicity» to cryobiology // Cryobiology. – 1986. – Vol. 23, №1. – P. 1–13.
39. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, №3. – P. 545–553.
40. Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide // J. Phys. Chem. B. – 2007.– Vol. 111, №33. – P. 10453–10460.
41. Khuri S.F., Healey N., MacGregor H. et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid–preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1999. – Vol. 117. – P. 172–185.
42. Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Koschiy S.V., Lugovoy V.I. Platelet cryopreservation. New cryoprotectants their freezing // 36th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. – Marseille, France, 1999. – P. 24.
43. Liu K. Y., Dong W.C., Wang Y.L. et al. Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoetic cells // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2004. – Vol. 12, №5. – P. 670–673.
44. Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // Transplant Proc. – 2004. – Vol. 36, №4. – P. 1133–1134.
45. Mazur P. Principles of cryobiology // Life in the frozen state / Ed. by B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson: – Boca Raton: CRS Press, 2004. – P. 3–66.
46. Pribor D.B. Osmotic hemolysis contrasted with freeze-thaw hemolysis // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8, №1. – P. 14–24.

47. Rowley S.D., Feng Z., Chen L. et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch // Bone Marrow Transplant. – 2003. – Vol. 31, №11. – P. 1043–1053.
48. Singbartl K., Langer R., Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes // Cryobiology. – 1998. – Vol. 36, №2. – P. 115–123.
49. Sputtek A., Langer R., Singbartl K. Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starh // CryoLetters. –1995. – Vol. 16, №2. – P. 283–288.
50. Sum A.K., Pablo J.J. Molecular study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipids bilayers // Biophys. J. – 2003 – Vol. 85, №6. – P. 3636–3645.
51. Takahashi T., Hirsh A., Williams R.J. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solution // Biophys. J. – 1988 – Vol. 54, №3. – P. 509–518.
52. Valeri C.R., Rango G., Khuri S. Freezing human platelets with 6 percent dymetyl sulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and storage at –80°C without postthaw processing // Transfusion. – 2005. – Vol. 45, №12. – P. 1890–1898.
53. Xiao H., Harvey K., Labarrere C.A., Kovacs R. Platelet cryopreservation using a combination of epinephrine and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // Cryobiology. – 2000. – Vol. 41, №2. – P. 97–105.

Холодовая адаптация пойкилотермных и гетеротермных животных

А.К. Гулевский, И.И. Щенявский*, Л.И. Релина,
Е.А. Грищенкова, В.И. Загнойко, О.С. Терещенко

Отдел биохимии холодовой адаптации
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: ivanou@rambler.ru*

В многообразии проявлений жизни четко выделяются состояние активной жизнедеятельности (передвижение, питание, размножение и развитие) и покоя разной степени и продолжительности, обусловленного периодическим подавлением метаболизма внутренними и внешними факторами.

Активная жизнедеятельность подавляющего большинства организмов на Земле осуществляется, как правило, в диапазоне от 0 до 60°С. Понижение температуры среды за рамки тепловой жизненной зоны организмов, недостаток воды и кислорода – главнейшие причины замедления и подавления активной жизнедеятельности.

Жизнь на Земле эволюционно развивалась при суточной и сезонной периодичности тепла и влаги, распределение которых на разных широтах и высотах планеты неодинаково. Условия температурного режима в умеренных климатических зонах ограничивают активную жизнедеятельность многих животных 6–7-ю достаточно теплыми месяцами в году. Остальное время года, когда температура среды падает ниже порога активной жизнедеятельности животных, они пребывают в состоянии пониженного метаболизма – холодового оцепенения или же других более сложных физиологических состояний, в разной степени способ-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 127–164.
© А.К. Гулевский, И.И. Щенявский, Л.И. Релина и др., 2012

ствующих защите организма от недостатка тепла, влаги, кислорода и т. д. В арктических и антарктических широтах жизнь «подавляется» в большей степени и на более продолжительное время из-за недостатка тепла.

Используемые сокращения
ТПО – точка переохлаждения
НЛТ – низшая летальная температура
ЦГИ – циклогексимид
ПААГ – полиакриламидный гель
ЛГД – лактатдегидрогеназа

Нижняя граница активной жизнедеятельности организмов определяется прежде всего количеством свободной воды, пул которой в организме поддерживает трехмерность биомакромолекул, а также непрерывность процессов ассимиляции и диссимиляции. Если верхний диапазон витальной зоны, который определяется тепловой денатурацией белков, довольно узкий, то нижний – более широкий. Этот феномен обусловлен прямой и косвенной адаптацией к сохранению части воды в жидком состоянии, выработавшейся у организмов в процессе эволюции.

1. Холодовая адаптация пойкилотермов

Холодоустойчивые беспозвоночные

Большинство наземных беспозвоночных, обитающих в высоких широтах, выживают в зимний период при низкой температуре по одной из двух стратегий: устойчивость к замерзанию либо избегание замерзания путем переохлаждения в зависимости от способности конкретного вида выживать при кристаллизации жидкостей тела [28].

Традиционно холодоустойчивость характеризуется такими показателями, как точка переохлаждения (ТПО), низшая летальная температура (НЛТ), время (при постоянной температуре) или температура (за фиксированный промежуток времени), при которых гибнут 50% популяции. В то же время использовать ТПО как единственный параметр для описания или сравнения холодоустойчивости насекомых не вполне адекватно, поскольку гибель и повреждения в результате охлаждения зачастую происходят при отсутствии замерзания жидкостей тела. Способность к переохлаждению может быть результатом не связанных с холодом адаптаций, например устойчивости к обезвоживанию [34]. Кроме того, неко-

Рис. 1. Основные компоненты холодоустойчивости беспозвоночных [9].

торые авторы считают [10], что распределение ТПО имеет бимодальный характер и, возможно, оно связано с половым диморфизмом.

На рис. 1 дано схематическое изображение основных компонентов холодоустойчивости беспозвоночных [28].

Насекомые – одни из самых крупных многоклеточных животных, способных выдерживать длительное глубокое охлаждение. Личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (семейство *Tenebrionidae*) являются классическим объектом исследования избегающих замерзания организмов. Известно, что в период холо-

довой акклимации у личинок *T. molitor* происходит накопление антифризных белков [28]. Таким образом, белок-синтезирующий аппарат должен сохранять функциональную активность при низких температурах.

Нами были изучены особенности функционирования белок-синтезирующего аппарата *T. molitor* в условиях охлаждения и холодовой акклимации [25]. Было установлено, что синтез белков сохраняется в процессе холодовой акклимации личинок при 5°С в течение 2 недель (рис. 2), причем количество новообразованных белков постоянно увеличивается.

Важно отметить, при изучении синтеза белков с помощью включения ^{14}С-аминокислот после холодовой акклимации личинок в течение 2 недель при 5°С достоверного отличия синтеза белков в зависимости от длительности инкубации при 5°С не обнаружено (рис. 3).

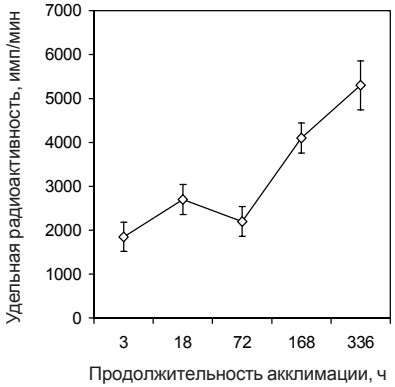


Рис. 2. Кинетика включения ^{14}С-аминокислот во время холодовой акклимации при 5°С личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*. Общая активность метки – 0,5 мкКюри/особь. Данные выражены в расп/мин в образце гомогената объемом 50 мкл; M ± m; *n* = 3–6.

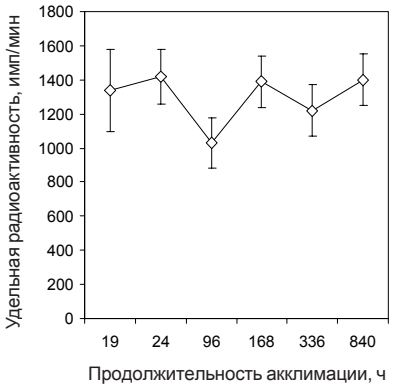


Рис. 3. Включение ^{14}С-аминокислот после 2-недельной холодовой акклимации при 5°С личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*. Общая активность метки – 0,5 мкКюри/особь. Данные выражены в расп/мин в образце гомогената объемом 50 мкл; M ± m; *n* = 3–6.

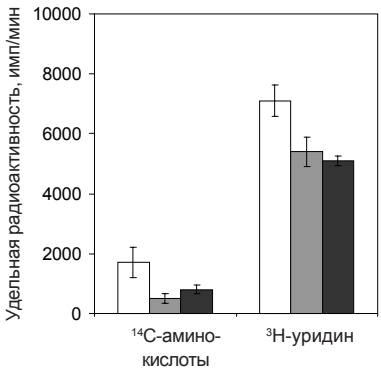


Рис. 4. Ингибирующий эффект ЦГИ и α-аманитина на включение ^{14}С-аминокислот и ^{3}Н-уридина в кислотонерастворимую фракцию личинок 8–10-х возрастов *T. molitor* при охлаждении (5°С, 3 ч): □ – контроль; ▨ – введение ЦГИ, 6 мкг/особь; ■ – введение α-аманитина, 0,03 мкг/особь. Общая активность метки – 0,5 мкКюри/особь для смеси ^{14}С-аминокислот и 10 мкКюри/особь для ^{3}Н-уридина. Данные выражены в расп/мин в образце гомогената объемом 50 мкл; M ± m; *n* = 3–6.

Ингибиторный анализ, проведенный с помощью антибиотиков, подавляющих синтез белков (циклогексимида (ЦГИ)) и синтез РНК (α-аманитина), показывает, что во время холодовой акклимации действительно происходит синтез РНК и белков (рис. 4).

В ходе понижения температуры происходят перестройки белоксинтезирующего аппарата. С целью выяснения характера этих перестроек нами была изучена зависимость Аррениуса включения ^{14}С-аминокислот в белки и ^{3}Н-уридина в РНК [7]. При сравнении данных, представленных на рис. 5, установлено, что профили кривых температурной зависимости включения ^{14}С-аминокислот в белки акклимированных и неакклимированных личинок в целом аналогичны. Это указывает на исходную готовность их белоксинтезирующего аппарата реагировать на холод. Вместе с тем в обоих случаях при температуре 0…10°С наблюдаются изломы кривых Аррениуса, что указывает на температурозависимые перестройки в системе синтеза белков.

Примерно в этом же температурном диапазоне были зарегистрированы изломы температурной зависимости включения ^{3}Н-уридина в суммарные РНК личинок *T. molitor* (рис. 6).

После холодовой акклимации в течение двух и более недель при 5°С изменяется качественный состав белков, в частности, наиболее заметно появление на электрофореграммах белка с молекулярной массой 65 кДа [6]. Появление этого белка у отдельных

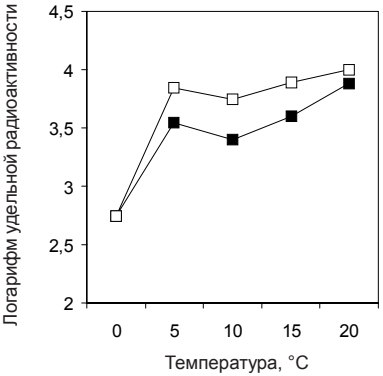


Рис. 5. Температурная зависимость включения ^{14}С-аминокислот в белки личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*: □ – неакклимированные личинки; ■ – акклимированные личинки. Общая активность метки – 0,5 мкКюри/особь. Данные выражены в расп/мин в образце гомогената объемом 50 мкл; M ± m; *n* = 3–6. Удельная радиоактивность выражена в имп/мин.

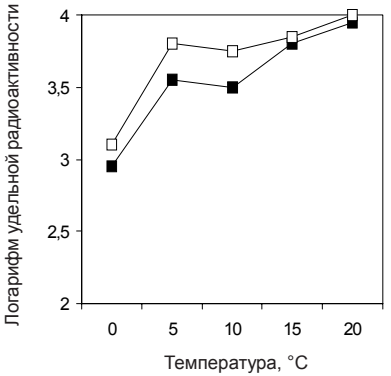


Рис. 6. Температурная зависимость включения ^{3}Н-уридина в суммарные РНК личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*: □ – неакклимированные личинки; ■ – акклимированные личинки. Общая активность метки – 10 мкКюри/особь. Данные выражены в расп/мин в образце гомогената объемом 50 мкл; M ± m; *n* = 3–6. Удельная радиоактивность выражена в имп/мин.

особей наблюдается уже на 3-е сутки акклимации, на 7-е сутки количество особей с этой полосой увеличивается и к 14-м суткам достигает 75% (рис. 7).

Следует отметить, что белок с молекулярной массой 65 кДа присутствует у некоторых неакклимированных особей (примерно у 25% особей из исследованной выборки) [6, 25]. После акклимации количество особей, у которых присутствует этот белок, возрастает до 75%. При возвращении насекомых в условия комнатной температуры (деакклимации) качественные изменения состава белков сохраняются некоторый период времени (рис. 8). Затем спектр белков начинает постепенно меняться, и к 7-м суткам белковые образцы деакклимированных личинок становятся сходными с таковыми у неакклимированных личинок (рис. 9). Примерно у 25% деакклимированных особей присутствует белок 65 кДа.

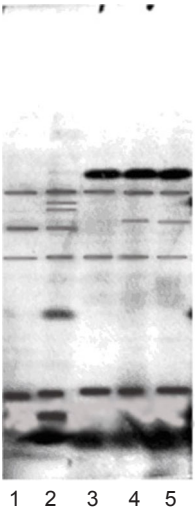


Рис. 7. Спектры белков из тканей личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*: 1–2 – неакклимированных; 3–5 – акклимированных. SDS-электрофорез проводили в градиентном (12,5–25%) полиакриламидном геле (ПААГе). Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

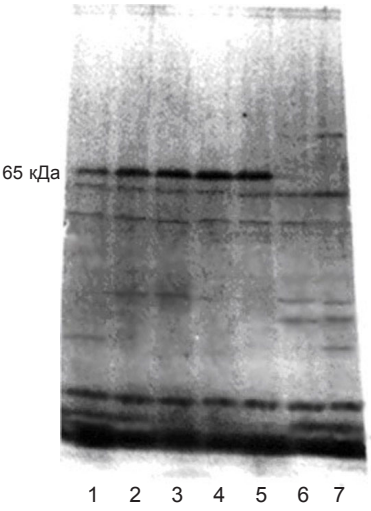


Рис. 8. Спектры белков из тканей личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*: 1–3 – акклимированных; 4–5 – деакклимированных в течение 3 суток; 6–7 – неакклимированных. SDS-электрофорез проводили в градиентном (12,5–25%) ПААГе. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

Важно отметить, что качественные изменения в спектре белков, по крайней мере полосы 65 кДа, возможно действительно связаны с синтезом белков *de novo*, так как она практически не обнаруживается при введении в организм ЦГИ (рис. 10).

Только у 32% акклимированных личинок, которым был введен ЦГИ, отмечено появление белка 65 кДа. Данные денситометрии показывают, что снижение содержания данного белка у личинок, которым был введен ЦГИ, составляла 50% по отношению к его содержанию у акклимированных личинок, которым ингибитор не вводили (относительное содержание белка 65 кДа – 32,4% и 16,3% по данным денситометрии электрофореграмм для акклимиро-

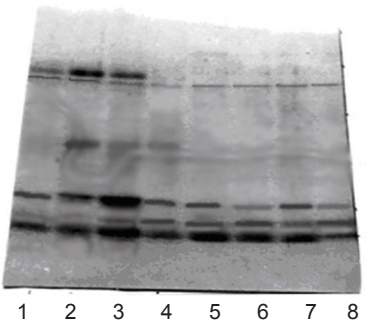


Рис. 9. Спектры белков из тканей личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*:1–3 – акклимированных; 4–6 – неакклимированных; 7–8 – деакклимированных в течение 7 суток. SDS-электрофорез проводили в градиентном (12,5–25%) ПААГе. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

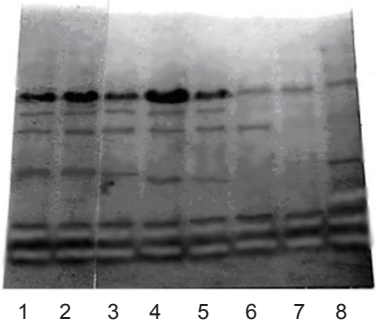


Рис. 10. Спектры белков из тканей личинок 8–10-х возрастов *T. molitor*: 1–5 – акклимированных; 6–8 – после введения ЦГИ (3 мгк/особь) перед 2-недельной холодовой акклимацией при 5°С. SDS-электрофорез проводили в градиентном (12,5–25%) ПААГе. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

ванных личинок без введения ингибитора и личинок, акклимировавшихся после введения ЦГИ соответственно).

Данный белок, видимо, принадлежит к группе холодовых белков-адаптогенов, которые отличны от белков-антифризов и не имеют непосредственного отношения к способности личинок переохлаждаться. Возможно, его присутствие необходимо на более поздних этапах после охлаждения для репарации повреждений, возникших в результате холодового шока. Например, он может принадлежать к классу стрессовых белков типа белков-шаперонов, появляющихся у многих организмов при действии различных неблагоприятных факторов внешней среды (в том числе и низкой температуры [32]).

Сравнение белковых спектров из тканей акклимированных и неакклимированных куколок большого мучного хрущака показало, что на этой стадии онтогенеза качественных различий в составе белков после акклимации не наблюдается [25]. В спектрах белков, полученных из тканей имаго до и после холодовой

акклимации, заметны качественные различия. После 2-недельной акклимации при 5…7°С в области 65 кДа появляется фракция, отсутствующая у неакклимированных жуков. Качественные изменения в одной и той же области молекулярных масс у личинок и имаго позволяют предположить сходный характер адаптационных реакций на различных стадиях онтогенеза.

Таким образом, в условиях низкотемпературной акклимации наблюдаются качественные и количественные изменения спектра белков у акклимированных личинок и имаго большого мучного хрущака *T. molitor*, о чем свидетельствуют данные SDS-электрофореза в ПААГе. Установлено, что при акклимации в условиях пониженной температуры 5…7°С появляется новая белковая полоса, соответствующая протеину с молекулярной массой 65 кДа, отсутствующая у большинства особей при комнатной температуре. На возможность синтеза этого белка *de novo* указывает существенное количественное уменьшение данной полосы в белковых образцах особей, которым перед акклимацией вводили ЦГИ. Данные изменения носят лабильный характер, поскольку после деакклимации при комнатной температуре, указанный белок встречается с такой же частотой, как и до акклимации.

Холодоустойчивые позвоночные-пойкилотермы.

Среди позвоночных пойкилотермов виды, способные выживать при низких температурах, встречаются в различных таксонах. Наиболее хорошо изучены в этом отношении арктические и антарктические рыбы, в крови которых содержатся антифризные белки [1], и устойчивые к замерзанию земноводные [37]. Пресноводные рыбы исследованы в меньшей степени, хотя представители семейства карповых (Cyprinidae) карп и карась хорошо известны своей способностью выдерживать длительную гипоксию и гипотермию.

Можно ожидать, что белок-синтезирующий аппарат и спектр белков, способных к холодовой акклимации пресноводных рыб, будут претерпевать изменения при смене температурного режима. Мы исследовали белковые спектры тканей карася обыкновенного *Carassius auratus* в зависимости от сезона и температуры воды. При сравнении белковых спектров образцов тканей карасей

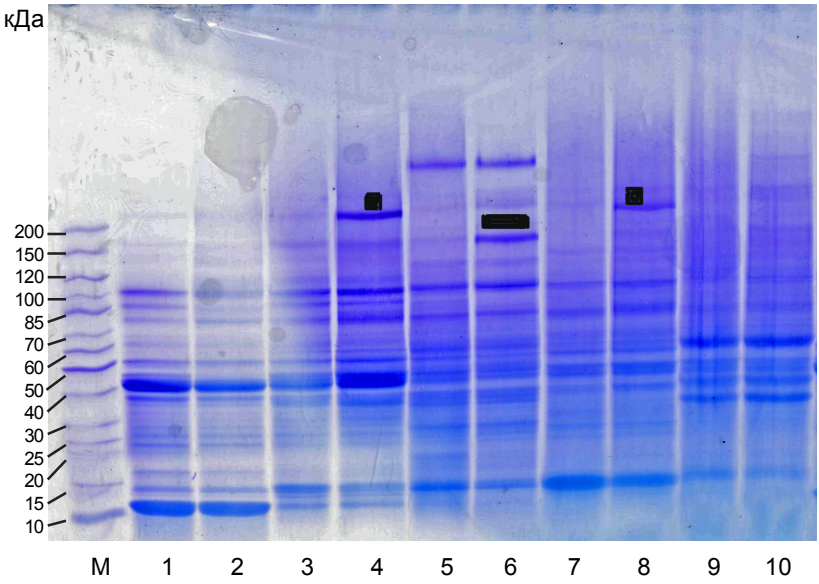


Рис. 11. Спектр белков тканей *C. auratus* зимой до и после деакклимации: М – маркеры молекулярного веса; 1, 2 – белые мышцы; 3, 4 – красные мышцы; 5, 6 – печень; 7, 8 – сердце, 9, 10 – мозг; 1, 3, 5, 7, 9 – деакклимированные рыбы; 2, 4, 6, 8, 10 – «зимние» рыбы; ■ – белок 205 кДа; ▬ – белок 172 кДа. SDS-электрофорез проводили в градиентном (10–25%) ПААГе. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

наиболее примечательным является практически полное исчезновение полосы 205 кДа в красных мышцах и сердце зимой после акклимации при комнатной температуре (деакклимации) (рис. 11) [12, 24]. Эти изменения могут быть частью комплексной перестройки сократительной системы мышц при смене температурного режима.

В наших экспериментах установлено, что в белых мышцах *C. auratus* зимой в условиях деакклимации при температуре 20°С наблюдается только незначительное уменьшение полос 105 и 45 кДа (см. рис. 11).

Практически отсутствуют сведения о белковых спектрах головного мозга в зависимости от сезона и температуры содержания.

На полученной нами электрофореграмме выявлено единственное отличие в составе белков мозга «зимних» и деакклимированных карасей – незначительное увеличение полосы 117 кДа при температуре содержания 20°С (см. рис. 11) [24].

В печени у «зимних» карасей присутствует четко выраженная полоса 172 кДа, которая практически исчезает после деакклимации. Кроме того, при деакклимации незначительно уменьшается полоса 205 кДа [12, 24].

SDS-электрофорез белков из тканей рыб, выловленных в летний период, показал такие же отличия в спектрах белков «зимних» и «летних» карасей, как и в спектрах белков «зимних» и деакклимированных карасей (рис. 12). Наши наблюдения по этому поводу согласуются с результатами Vornanen M. [40], который отмечал наличие одинаковых изоформ тяжелых цепей миозина в миокарде

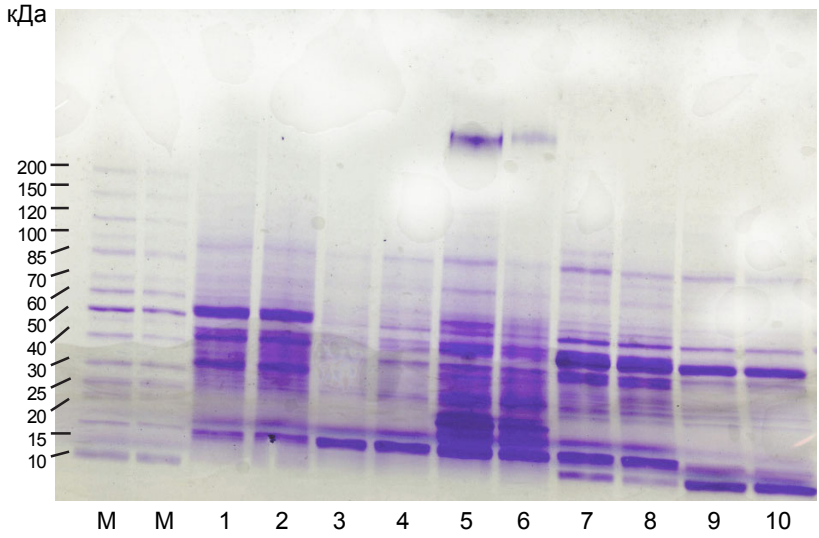


Рис. 12. Спектр белков тканей *C. auratus* летом и после деакклимации зимой: М – маркеры молекулярного веса; 1, 2 – белые мышцы; 3, 4 – красные мышцы; 5, 6 – печень; 7, 8 – сердце, 9, 10 – мозг; 1, 3, 5, 7, 9 – деакклимированные рыбы; 2, 4, 6, 8, 10 – «летние» рыбы; SDS-электрофорез проводили в градиентном (10–25%) ПААГе. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

«летних» карасей и карасей, акклимированных при 22°С в лабораторных условиях. Vornanen M. также отмечал наличие только одной изоформы тяжелой цепи миозина в миокарде *C. carassius* зимой и во время холодовой акклимации при 2°С в лабораторных условиях по сравнению с присутствием двух изоформ у «летних» рыб. Однако мы не наблюдали изменений в белковых спектрах тканей *C. auratus* после поэтапной холодовой акклимации летом (7 суток при 7°С, после чего рыб переносили в холодовую камеру с температурой 3°С еще на 7 суток) (рис. 13). Очевидно, для изменения состава белков требуется более длительная экспозиция при низкой температуре [24].

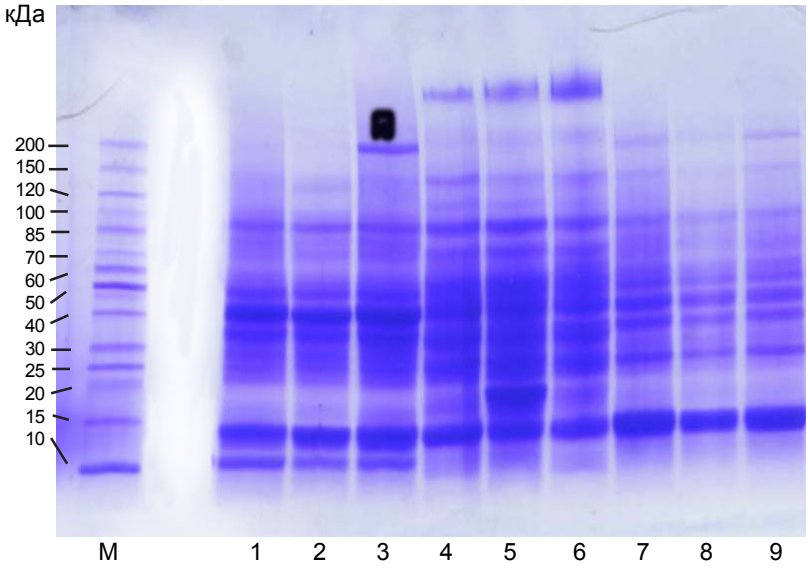


Рис. 13. Спектр белков тканей *C. auratus* зимой после деакклимации, летом после холодовой акклимации и весной: М – маркеры молекулярного веса; 1, 2, 3 – белые мышцы; 4, 5, 6 – печень; 1, 4, 7 – деакклимированные рыбы; 2, 5, 8 – «летние» рыбы после 2-недельной холодовой акклимации; 3, 6, 9 – «весенние» рыбы; ■ – белок 205 кДа. SDS-электрофорез проводили в градиентном (10–25%) ПААГе. Окрашивание Coomassie Brilliant Blue G-250.

Тем не менее сезонные ритмы оказывают значительное влияние на белковый состав тканей *C. auratus*, так как у рыб, выловленных весной из пруда с температурой воды 5°С, только в красных мышцах присутствует белок 205 кДа, свойственный «зимним» рыбам, а в миокарде эти различия уже не наблюдаются (рис. 13). В печени также исчезает белок 172 кДа [13]. Это свидетельствует о том, что в тканях карася в весенний период, несмотря на низкую температуру окружающей среды, происходят биохимические изменения, направленные на переключение организма на летний режим функционирования.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что во время деакклимации карася серебряного *C. auratus* при температуре 20°С в зимний период времени меняется спектр белков красных мышц, сердца и печени, что проявляется в существенном количественном уменьшении полос 205 и 172 кДа соответственно. Поскольку мы не наблюдали отличий в белковых спектрах «летних» и деакклимированных рыб, можно принять, что условия деакклимации в эксперименте воспроизводили летний режим существования рыб. Двухнедельная холодовая акклимация в летний период не оказывала влияния на спектры белков тканей *C. auratus*. Сезонные ритмы, судя по нашим результатам, играют существенную роль в перестройках белкового состава, так как в марте, несмотря на низкую температуру воды, сходную с зимней температурой, белковый состав тканей печени и сердца уже не отличается от такового у «летних» рыб. Только в красных мышцах в это время наблюдался белок 205 кДа, характерный для зимнего периода.

Приспособительные механизмы метаболизма, вызванные колебаниями температуры, тесно связаны с процессами генерирования энергии в метаболических путях гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Поскольку лактатдегидрогеназа (ЛДГ) является заключительным ферментом гликолиза, уровень ее активности используют в качестве показателя интенсивности анаэробного обмена.

Наши данные показывают (рис. 14), что активность ЛДГ в белых мышцах весьма высока и в летний, и в зимний периоды, причем ее активность в белых мышцах существенно выше, чем в красных, так как энергообеспечение в белых «быстрых» мышцах осу-

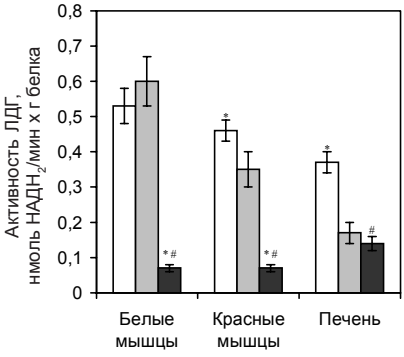


Рис. 14. Активность ЛДГ в направлении пируват > лактат в тканях карася *C. auratus*: □ – зимой; ▨ – летом; ■ – после 3-дневной холодовой акклимации летом; *, # – достоверные отличия по сравнению с «летними» и «зимними» рыбами соответственно; $p < 0,05$, $n = 10$). Условия определения активности ЛДГ см. в [24].

ществляется в основном за счет анаэробного окисления [11, 24]. В красных мышцах зимой активность ЛДГ достоверно выше по сравнению с летом, что свидетельствует об увеличении роли гликолиза зимой и для этого типа ткани.

Деакклимация карасей зимой при температуре 20–22°С приводила к существенному понижению активности ЛДГ по сравнению с зимними величинами во всех изученных тканях. В красных мышцах и печени активность фермента возвращалась к летнему уровню, а в белых мышцах была даже ниже [24].

Мы также исследовали возможность холодовой акклимации карасей в летний период. Следует отметить, что после помещения рыб в холодовую камеру летом при температуре 5–6°С, они гибли в течение 3–5 суток (см. также ниже). Активность ЛДГ, измеренная на 3-и сутки холодовой экспозиции «летних» рыб, оказалась чрезвычайно низкой и в белых, и в красных мышцах [24]: в белых мышцах – 11,7 и 13,2% по отношению к «летним» и «зимним» значениям соответственно, а в красных – 20,0 и 15,2% по отношению к «летним» и «зимним» значениям соответственно. Чрезвычайно резкое падение активности ЛДГ в мышцах в этих условиях нам представляется особенно важным. Данное обстоятельство свидетельствует о серьёзных нарушениях регуляции производства энергии в метаболических путях, что может быть одной из причин гибели рыб в этих условиях.

Поскольку ЛДГ является ферментом, который катализирует как восстановление пирувата до лактата, так и обратную реакцию

окисления лактата до пирувата, необходимо принимать во внимание одновременное действие разных ее изоформ в этих или иных условиях. В тканях карася, независимо от температуры акклимации, присутствует постоянный спектр изоформ [41]. Поэтому мы решили, что может оказаться информативным такой показатель, как соотношение активности ЛДГ в направлении пируват→лактат к активности ЛДГ в направлении лактат→пируват (табл. 1).

При этом было выявлено, что удельная доля ЛДГ, которая превращает лактат в пируват, резко увеличивается после 3 суток холодовой акклимации летом [24]. Возможно, эта реакция является компенсаторной. Когда рыба попадает в воду с повышенным количеством растворенного кислорода, она начинает активно его потреблять. Но учитывая то, что караси гибнут через 3–5 суток холодовой экспозиции, этот процесс не может считаться адаптивной реакцией.

Содержание субстратов и продуктов реакции ЛДГ является еще одним общепринятым показателем уровня энергообмена. Несмотря на наличие сезонных изменений в активности ЛДГ, нам не удалось обнаружить сезонных колебаний содержания пирувата ни в белых, ни в красных мышцах (рис. 15, А) [24]. Хотя фермент

Таблица 1. Соотношение активности ЛДГ в направлении пируват→лактат к активности ЛДГ в направлении лактат→пируват в тканях карася *C. auratus*

Условия содержания	Ткань		
	Белые мышцы	Красные мышцы	Печень
Зима	1:9	1:15	1:9
Лето	1:12	1:25	1:34
3-дневная акклимация при 4–5°С летом	1:88	1:106	1:40

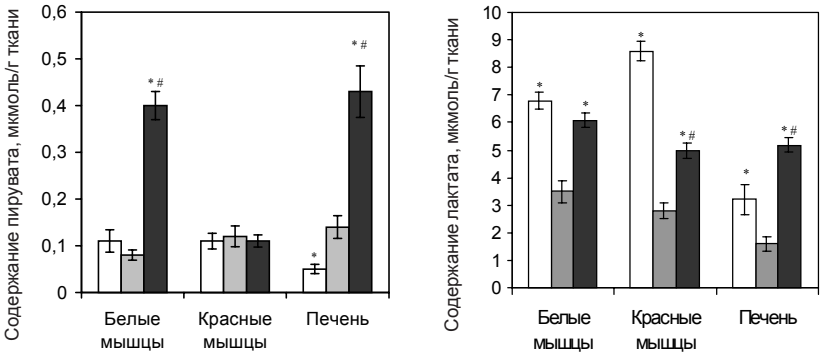


Рис. 15. Содержание пирувата (А) и лактата (Б) в тканях *C. auratus*: □ – зимой; ▒ – летом; ■ – после 3-дневной холодовой акклимации летом; *, # – достоверные отличия по сравнению с «летними» и «зимними» рыбами соответственно; $p < 0,05$, $n = 10$). Условия определения содержания пирувата и лактата см. в [24].

активнее использует пируват в качестве субстрата зимой, его количество в мышцах остается постоянным, возможно, за счет сокращения расхода в метаболических путях. Однако резкое снижение активности ЛДГ в белых мышцах после 3-дневной холодовой экспозиции карасей летом сопровождается значительным накоплением пирувата. Это согласуется с резким падением активности ЛДГ в направлении пируват→лактат в этих условиях. При этом в красных мышцах содержание пирувата не изменяется после 3 суток холодовой акклимации. Количество пирувата в печени зимой снижается на 64,3%. Возможно, печень продолжает достаточно интенсивно его расходовать на глюконеогенез, который в печени является одним из основных потребителей пирувата.

Содержание лактата летом существенно снижается в обоих типах мышц по сравнению с зимним периодом (рис. 15, Б). Результаты наших исследований по измерению содержания лактата после 3-дневной холодовой экспозиции показали, что его уровень в мышцах резко возрастает, несмотря на падение активности ЛДГ, которая его нарабатывает, и относительно высокую активность ЛДГ в направлении лактат→пируват (6,19 ± 0,17 и 7,40 ± 0,19 нмоль

Таблица 2. Соотношение лактат/пируват в тканях карася *C. auratus*

Условия содержания	Ткань		
	Белые мышцы	Красные мышцы	Печень
Зима	62:1	78:1	64:1
Лето	44:1	23:1	11:1
3-дневная акклимация при 4–5°С летом	17:1	45:1	12:1

пирувата/мин×мг белка для белых и красных мышц соответственно) [11]. Высокое содержание лактата в этих условиях может объясняться снижением активности фермента, когда его ингибирование происходит по принципу обратной связи.

Соотношение лактат/пируват является одним из показателей, которые отображают активацию или ингибирование процессов энергообеспечения – гликолиза и цикла Кребса. В данных условиях этот показатель изменяется неоднозначно для каждой из исследованных тканей (табл. 2).

В белых мышцах увеличивается удельная доля пирувата после холодовой акклимации летом по сравнению с летними значениями [24]. В красных мышцах после 3-дневной акклимации летом удельная доля пирувата значительно снижается. В печени соотношение лактат/пируват практически не изменяется после 3 суток холодовой акклимации.

Одним из направлений исследований гипотермии является поиск биорегуляторов, возникших в процессе эволюции, которые контролируют переход организма на зимний режим. Такие вещества выделены из тканей гибернирующих и эстивирующих животных [22, 38]. Из тканей гетеротермных животных выделяли низкомо-

лекулярные фракции, иньекции которых приводили к снижению уровня метаболизма и температуры у животных. Пресноводные рыбы в этом аспекте остаются практически неисследованными.

Мы выделили низкомолекулярную фракцию (до 5 кДа) из мозга холодоадаптированных («зимних») карасей и исследовали ее влияние на выживаемость рыб в низкотемпературных условиях летом и на содержание АТФ. Исследования влияния резкого снижения температуры на выживаемость карасей *C. auratus* проводили в июле, когда температура воды не опускалась ниже 23°C [3, 5, 24]. Одну группу карасей помещали в холодовую камеру с температурой 5–6°C. Через 3 суток в таких условиях погибли 20% особей, на 4-е сутки – еще 20%, остальные – через 5 суток. Другая группа рыб содержалась в тех же условиях, но им накануне холодовой экспозиции внутрибрюшинно была введена фракция до 5 кДа из мозга «зимних» карасей. Все рыбы из этой группы были живы на протяжении 9 суток холодовой акклимации.

На 3-е сутки, когда рыбы начинали гибнуть, у еще живых особей определяли содержание АТФ в белых и красных мышцах. Контролем были рыбы, которых содержали при 20–22°C, то есть «летние». Показано, что в мышцах уровень АТФ практически не отличался от контроля: 133,0 ± 2,31 и 100,3 ± 4,18 мкг/г сырого веса ткани в белых и красных мышцах соответственно (рис. 16) [3, 5]. Если рыбам вводили фракцию до 5 кДа из мозга «зимних» карасей, то уровень АТФ снижался на 37 и 34% в белых и красных мышцах соответственно по сравнению с контролем. Возможно, что одной из причин гибели рыб при резком снижении температуры может быть возникновение метаболического блока, в результате которого нарушаются синтез и расход макроэргических соединений.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что особи *C. auratus* не способны быстро акклимироваться к низкой температуре в летний период. При этом у них резко изменяются отдельные показатели энергообмена: снижается активность ЛДГ и увеличивается количество лактата в обоих типах мышц и содержание пирувата в белых мышцах. Резкое снижение температуры воды летом вызывает гибель рыб в течение 3–5 суток, при этом уровень АТФ в мышцах *C. auratus* остается неизменным.

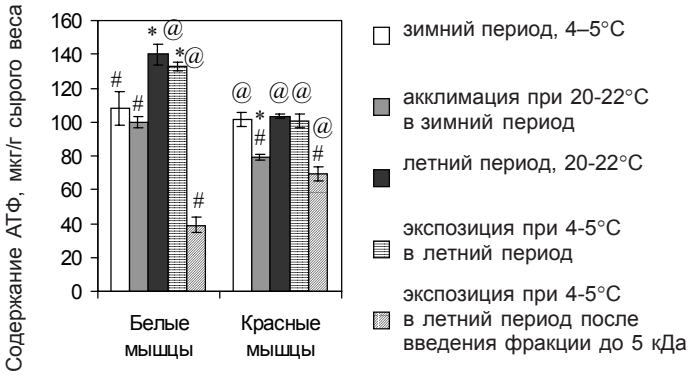


Рис.16. Содержание АТФ в тканях *C. auratus* в разные периоды года, после акклимации и введения фракции до 5 кДа из мозга «зимних» особей (достоверные отличия по сравнению: * – с акклимацией при 20–22°С зимой, # – летом, @ – экспозицией при 4–5°С летом; $p < 0,05$; $n = 10$). Условия определения содержания АТФ см. в [24].

Выделенная из мозга холодоадаптированных рыб низкомолекулярная фракция до 5 кДа обладает биологической активностью, поскольку её предварительное введение обеспечивает выживание особей при смене температурного режима летом, что сопровождается значительным снижением содержания АТФ в мышцах.

2. Холодовая адаптация гетеротермов

Среди теплокровных животных широко распространено сезонное снижение интенсивности энергетического обмена, являющееся механизмом приспособления к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. В настоящее время примерно у 200 видов млекопитающих – представителей более 70 родов из 27–30 семейств, относящихся к 6–7 отрядам, установлен феномен оцепенения. Зимняя спячка встречается у млекопитающих, по крайней мере, 5 отрядов. Наибольшее число видов, впадающих в зимнюю спячку и другие состояния оцепенения, относится к отрядам грызунов, рукокрылых и насекомоядных. Зимняя спячка относительно более распространена у видов, обитающих в холодных и горных

областях. Вместе с тем какой-либо более определенной зависимости распространения животных, впадающих в оцепенение, от экологических условий разных климато-географических зон не установлено. Существуют виды как с очень узким ареалом обитания (например, генотипически холодоадаптированная якутская порода лошади), так и с очень широким, к которым можно отнести тринадцатиполосого суслика *Citellus tridecemlineatus*, ареал которого охватывает, по крайней мере, 4 климатические зоны – от Мексиканского залива до Внутренней Канады. В процессе зимней спячки скорость обменных процессов у сусликов падает в десятки и даже сотни раз при снижении температуры тела более чем на 30°С и при сохранении активирующих механизмов, способствующих выходу животных в гомойотермное состояние. В период зимней спячки температура тела зимоспящих сусликов до 80% времени находится на пониженном уровне, всего на 1–2°С превышая температуру окружающей среды. Например, у длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* температура тела может понижаться вплоть до 0°С. При падении температуры среды ниже этого значения животные или пробуждаются, или повышают уровень метаболизма без пробуждения.

Понимание процессов, происходящих на клеточном, органном и организменном уровнях в процессе гибернации, раскрытие механизмов гуморальной регуляции уровня обмена веществ и физиологических функций животных в состоянии зимней спячки, холодового оцепенения и холодовой адаптации открыло бы путь к разработке методов получения состояния искусственного гипобиоза, основанного на естественных физиологических механизмах, и могло бы найти применение как в экспериментальной биологии, так и в клинической медицине.

В настоящее время установлено, что состоянию гибернации в организме зимоспящих животных предшествует последовательный цикл биохимических адаптационных реакций. Показано, что в процессе подготовки и вхождения в состояние спячки наблюдаются изменения углеводного, липидного, белкового и нуклеинового обмена [17].

В процессе подготовки к зимней спячке, при вхождении и выходе из нее в клетках и тканях гетеротермных животных про-

исходят существенные структурно-функциональные перестройки внутриклеточных систем, в том числе и белок-синтезирующего аппарата, на уровне транскрипции и трансляции. С помощью меченых предшественников (^{14}С-аминокислот и ^{14}С-оротовой кислоты) нами был исследован синтез белков и РНК в клетках печени длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus*, находящихся в различных функциональных состояниях: в зимней спячке, при пробуждении и в активном состоянии (табл. 3) [18]. Обнаружен ЦГИ-ингибируемый синтез белков в клетках печени сусликов, которые находились в состоянии зимней спячки, протекающий, по-видимому, на предсуществующих полирибосомах. Низкий уровень синтеза белков у спящих сусликов обусловлен не только Аррениусовой зависимостью скорости этой многостадийной реакции, но и диссоциацией полирибосом при охлаждении животного, о чём свидетель-

Таблица 3. Интенсивность включения меченых предшественников в суммарные белки и РНК печени сусликов, находящихся в разных физиологических состояниях, и влияние на этот процесс ингибиторов

Функциональное состояние	Фракция гомогената	Включение ^{14}С-аминокислот, имп/мин на 15 мг ткани		Включение ^{14}С-оротовой кислоты, имп/мин на 15 мг ткани	
		При отсутствии ЦГИ	В присутствии ЦГИ	При отсутствии ЦГИ	В присутствии ЦГИ
Спячка	1	1200 ± 210	400 ± 150*	510 ± 120	390 ± 110
	2	28400 ± 3440	29300 ± 3680	4 700 ± 930	5100 ± 1500
Период пробуждения	1	21200 ± 1500	8800 ± 960*	5200 ± 1500	2300 ± 210*
	2	16400 ± 3000	12800 ± 3200	3 600 ± 800	6200 ± 1200
Бодрствование	1	24700 ± 1800	10300 ± 1100*	4 800 ± 820	2900 ± 330*
	2	12000 ± 2520	11200 ± 2800	3 200 ± 700	3700 ± 250

Примечания: фракции 1, 2 – кислотонерастворимая и кислоторастворимая фракции; * – достоверные отличия от данных, полученных при отсутствии ингибитора, $p < 0,05$.

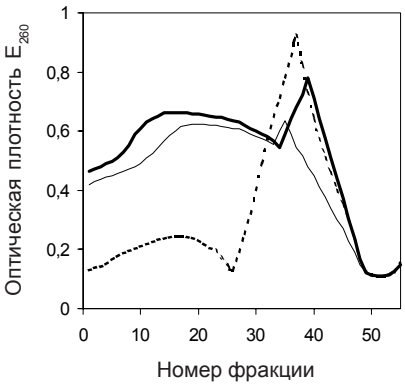


Рис. 17. Фракционирование полирибосом из печени сусликов в градиенте плотности сахарозы: ▬ – бодрствующие суслики; ▬ ▬ ▬ – суслики, находящиеся в состоянии спячки; ▬▬ – пробуждающиеся суслики.

ствуют резкое увеличение пика моносом и уменьшение пика полирибосом профилей седиментации (рис. 17). При исследовании синтеза РНК у сусликов, находящихся в состоянии спячки, было обнаружено, что у них он достоверно не проявляется (табл. 3). Таким образом, можно предположить, что синтез белков у сусликов в состоянии спячки происходит преимущественно на предшествующих матрицах иРНК, хранящихся в цитоплазме клеток спящих животных в виде информосом, а не на поступающих в цитоплазму *de novo*. Наблюдаемое при седиментационном анализе рибосомного материала из печени просыпающихся животных существенное «утяжеление» профиля седиментации по сравнению с профилем седиментации рибосомного материала из печени животных, находящихся в состоянии спячки, позволяет предположить, что интенсификация синтеза белков в период пробуждения сусликов связана с формированием полирибосом из моносом. Данное предположение подтверждается тем фактом, что рибосомный материал «тяжёлой» фракции из печени активных животных распадается под влиянием экзогенной РНКазы (0,02 мг/мл), разрушающей иРНК (рис. 18). В период пробуждения сусликов обнаружена интенсивная сборка полирибосом, даже в условиях ингибирования синтеза РНК актиномицином D, что указывает на содержание в клетках печени в период спячки пула иРНК, необходимого для наблюдающейся активации трансляции (рис. 19).

Наблюдаемые перестройки метаболизма, судя по имеющимся морфологическим и биохимическим данным [2, 4], приводят к изменению структуры клеток различных органов и тканей. По-

видимому, эти изменения происходят и в крови, что связано с особенностями выполнения функций форменными элементами и плазмой крови в условиях гипотермии.

Как известно, для выживания клеток при низких температурах важна их способность поддерживать ионный баланс, составляющими которого являются высокое внутриклеточное содержание K^+ и низкое содержание Na^+ и Ca^{2+}.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ионный состав эритроцитов длиннохвостых сусликов в течение года претерпевает существенные изменения. Так, содержание в них K^+ наиболее низкое в конце декабря – начале января. По мере приближения весны оно постепенно повышается и в апреле-мае достигает наиболее высокого уровня. Затем происходит его снижение и в течение лета этот показатель опускается до уровня значений февраля (табл. 4, рис. 20). Сезонные изменения содержания в эритроцитах сусликов другого одновалентного катиона, Na^+, выражены в меньшей

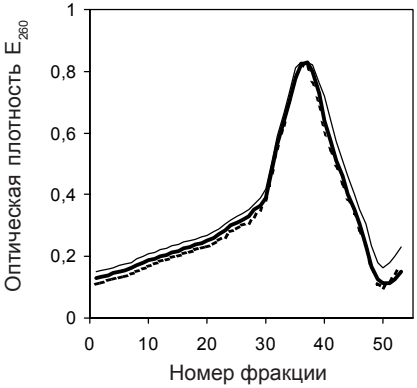


Рис. 18. Фракционирование полирибосом из печени сусликов в градиенте плотности сахарозы после обработки РНКазой: ▬ – бодрствующие суслики; ▬ ▬ – суслики, находящиеся в состоянии спячки; ▬ – пробуждающиеся суслики.

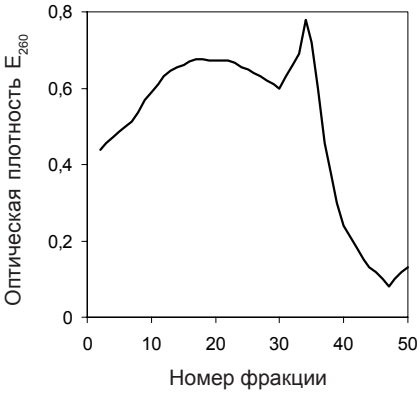


Рис. 19. Фракционирование полирибосом из печени сусликов, которым перед пробуждением был введён актиномицин D.

Таблица 4. Содержание одновалентных катионов в эритроцитах длиннохвостых сусликов

Показатель	Спячка (февраль)	Пробуждение между баутами (февраль)	Активность (май-июнь)
Внутренняя концентрация K^+, ммоль/л	88,1 ± 7,9*	92, 9 ± 8,1*	110,7 ± 7,1
Внутренняя концентрация Na^+, ммоль/л	27,3 ± 4,3*	25,6 ± 2,7*	19,5 ± 3,2
Оуабаинзависимый вход $^{86}Rb^+$, ммоль/л/ч	0,535 ± 0,60*	0,570 ± 0,065*	0,750 ± 0,055
Оуабаиннезависимый вход $^{86}Rb^+$, ммоль/л/ч	0,575 ± 0,070*	0,485 ± 0,065*	0,715 ± 0,035

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с показателями активных животных, $p \leq 0,05$.

степени. Заметно оно снижено лишь с марта по май, а затем повышается и к началу сентября оно столь же высоко, как в январе-феврале. С результатами исследования сезонных изменений внутриклеточного содержания одновалентных катионов хорошо коррелируют данные, полученные при изучении скорости накопления ими $^{86}Rb^+$ (табл. 4, рис. 21) [14].

Наблюдаемые изменения в ионном балансе эритроцитов сусликов и работе систем его поддержания, очевидно, мало зависят от того, в каком функциональном состоянии находится животное: спячки, бодрствования или искусственного пробуждения. Исследуемые показатели были практически одинаковы у животных, находящихся в различных состояниях в одно и то же время, а у сусликов, находящихся в одинаковых состояниях, но в разные месяцы, иногда сильно отличались. Очевидно, имеющиеся несоответствия в результатах разных авторов, работающих с эритроцитами одного и того же вида гибернаторов объясняются тем, что показатели ионного состава регистрировались ими в разное время.

Одна из актуальных проблем криобиологии – разработка новых технологий хранения крови и ее форменных элементов в условиях

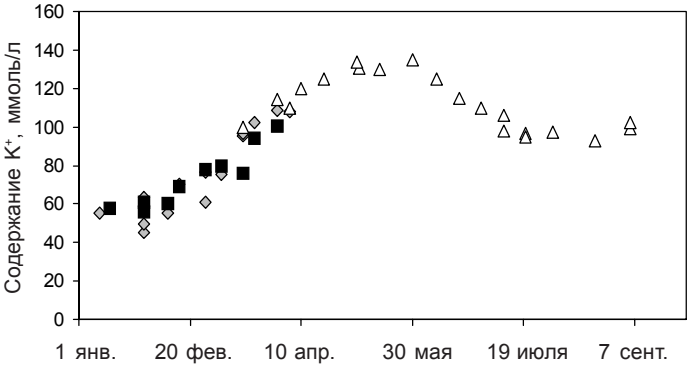


Рис. 20. Сезонные изменения содержания ионов K^+ в эритроцитах длиннохвостых сусликов: ◆ – спящие; ■ – искусственно пробуждённые; △ – активные.

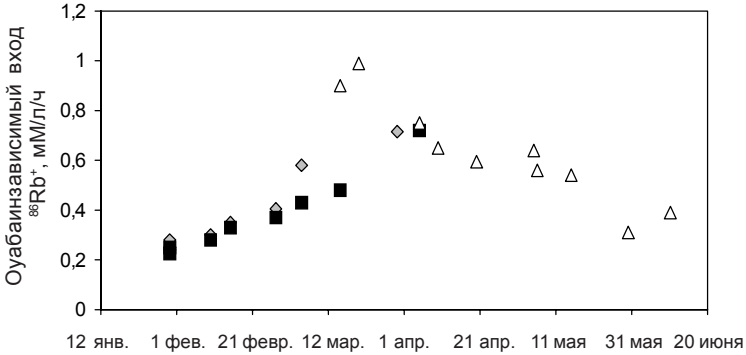


Рис. 21. Сезонные изменения скорости активного транспорта $^{86}Rb^+$ в эритроцитах длиннохвостых сусликов: ◆ – спящие; ■ – искусственно пробуждённые; △ – активные.

гипотермии. В этом отношении одним из перспективных направлений является изучение механизмов резистентности к пониженным температурам клеток зимоспящих животных [19]. Исследования влияния гипотермического хранения в течение одного месяца на ионный гомеостаз эритроцитов, находящихся в разных функциональных состояниях длиннохвостых сусликов (спящих

Таблица 5. Влияние гипотермического хранения в течение месяца на показатели ионного гомеостаза эритроцитов длиннохвостых сусликов

Показатель	Состояние животного					
	Гибернация, n = 10		Искусственное пробуждение, n = 10		Бодрствование, n = 8	
	1	2	1	2	1	2
Внутренняя концентрация K^+, ммоль/л	88,10 ± 7,91	45,6 ± 3,2	92,9 ± 8,1	40,4 ± 1,6	110,7 ± 7,1	25,0 ± 2,7
Внутренняя концентрация Na^+, ммоль/л	27,30 ± 4,31	41,40 ± 3,81	25,6 ± 2,7	51,2 ± 3,3	19,5 ± 3,2	61,1 ± 3,9
Оуабаинзависимый вход $^{86}Rb^+$, ммоль/л/ч	0,535 ± 0,060	0,230 ± 0,040	0,570 ± 0,065	0,095 ± 0,020	0,750 ± 0,055	0,035 ± 0,015
Оуабаиннезависимый вход $^{86}Rb^+$, ммоль/л/ч	0,575 ± 0,070	0,500 ± 0,085	0,485 ± 0,065	0,785 ± 0,075	0,715 ± 0,035	0,956 ± 0,045

Примечание: 1 – свежая кровь; 2 – кровь после одного месяца хранения.

и искусственно пробужденных – в феврале, а активных – в конце мая – начале июня), показали, что снижение внутриклеточного содержания K^+ и увеличение содержания Na^+ меньше всего заметно в клетках из крови гибернирующих сусликов. Несколько больше эти изменения характерны для эритроцитов искусственно пробужденных животных и очень сильно – активных (табл. 5).

С результатами исследования влияния гипотермического хранения на ионный состав эритроцитов сусликов согласуются данные, полученные при изучении влияния гипотермии на сохранность уровней оуабаинзависимого и оуабаиннезависимого включений $^{86}Rb^+$. Спустя месяц гипотермического хранения, у эритроцитов спящих сусликов была наиболее высокая скорость оуабаинзависимого входа $^{86}Rb^+$ и наиболее низкая скорость оуабаиннезависимого входа $^{86}Rb^+$, что свидетельствует о лучшем сохранении ими работоспособности Na^+/K^+-насоса и исходного уровня пассивного транспорта K^+ (табл. 5) [9].

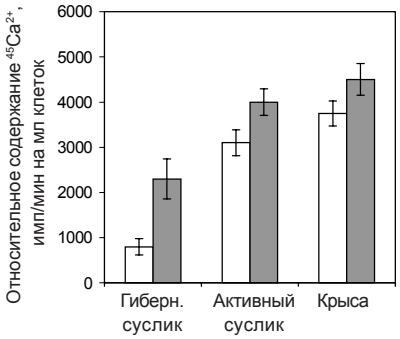


Рис. 22. Влияние гипотермического хранения в течение двух недель на накопление $^{45}Ca^{2+}$ эритроцитами: □ – La^{3+} отсутствует в среде; ▨ – La^{3+} присутствует в среде.

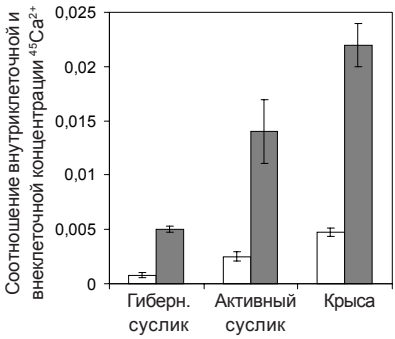


Рис 23. Влияние гипотермического хранения эритроцитов в течение двух недель на способность регулировать внутриклеточное содержание $^{45}Ca^{2+}$ после перенесения их в условия нормотермии: □ – La^{3+} отсутствует в среде; ▨ – La^{3+} присутствует в среде.

Как известно, Ca^{2+} является, в частности, активатором утечки из эритроцитов K^+ через так называемые каналы Гардоша. Хранение (при 2–5°С) эритроцитов спящего и активного сусликов и крысы с $^{45}Ca^{2+}$ показало, что в отличие от клеток гомойотермного животного и гибернатора в активном состоянии, клетки гибернирующего гибернатора способны активно откачивать поступающий в них Ca^{2+}. Это было установлено по разности уровней накопления эритроцитами $^{45}Ca^{2+}$ в присутствии ингибитора Ca^{2+}-насоса La^{3+} и без него (рис. 22 и 23) [26].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в состоянии спячки плазматические мембраны модифицируются таким образом, чтобы эффективно поддерживать ионный гомеостаз.

Клеточная мембрана выполняет три главные функции: 1 – обеспечивает селективно проницаемый барьер между двумя жидкими компартментами; 2 – формирует гидрофобный матрикс, стабилизирующий ферменты и гидрофобные белки, частично вовлекаясь

в реакции, связанные с преобразованием энергии и сохранением ионных градиентов; 3 – образует стабильную, но гибкую границу между клеткой и органеллами внутри клетки, обеспечивающую узнавание, преобразовывание и, возможно, хранение информации. Эти уникальные свойства в основном удовлетворяются оригинальной молекулярной моделью, предложенной S.J. Singler и S.E. Nicolson [35], и ее модификациями [36]. Главной особенностью этой модели является формирование липидами непрерывной двухслойной структуры с белками и их сегментарное, угловое и диффузное движение. Мембрана является стабильной благодаря тому, что гидрофобные и гидрофильные взаимодействия между молекулами липидов и между липидами и белками максимальны в жидких средах клетки и её окружения [29].

Наши исследования белкового состава мембран эритроцитов длиннохвостых сусликов, находящихся в состоянии спячки и искусственного пробуждения зимой, а также в активном состоянии летом [15], показали, что качественно он не меняется. Однако имеются значительные отклонения в относительном содержании некоторых белков. В частности, зимой независимо от состояния животного выявлено более высокое, чем летом, содержание спектрина и более низкое – актина. Очевидно, такими изменениями объясняется большая устойчивость мембранных белков зимних животных по сравнению с летними. Это подтверждается количеством белковых агрегатов, формирующихся при обработке эритроцитарных мембран сшивающим агентом – диамидом: в мембранах спящих сусликов образуется значительно меньшее количество SH-сшивок, несколько больше у искусственно пробуждённых, а у активных – столько же, как и в мембранах эритроцитов гомойотермного животного – крысы. Это свидетельствует об отличии термотропных свойств белков мембран клеток гетеро- и гомойотермных животных (табл. 6).

Исследования основных показателей химического состава липидов мембран эритроцитов длиннохвостых сусликов *Citellus undulatus* в предгибернационный период и по мере углубления гибернации [23] показали значительное увеличение содержания арахидоновой кислоты (основного представителя полиеновых жирных кислот в эритроцитарных мембранах) с наступлением

Таблица 6. Процентное содержание основных белков в эритроцитарных мембранах длиннохвостых сусликов по данным электрофореза, n = 10

Показатель	Состояние животного		
	Гибернация (зима)	Искусственное пробуждение (зима)	Активные животные (лето)
Агрегаты	4,2 ± 2,4	4,1 ± 1,2	4,5 ± 0,4
Спектрин	35,4 ± 6,0*	34,1 ± 3,9*	18,0 ± 2,1
Белок полосы 3	20,8 ± 4,2	16,6 ± 3,0	21,0 ± 4,0
Анкирин	6,8 ± 1,3	7,8 ± 1,9	8,7 ± 1,1
Полоса 4.1–4.2	8,9 ± 1,1	8,9 ± 0,4	8,1 ± 1,0
Актин	6,8 ± 1,1*	6,9 ± 0,5*	12,5 ± 0,5

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с показателями активных животных, $p \leq 0{,}05$.

гибернации, которое затем снижалось по мере углубления гибернации. Авторы связывают это с отмеченной ими активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), совпадающей по времени с уменьшением уровня арахидоната. Кроме того, содержание моноеновых жирных кислот (пальмитоолеиновой и олеиновой) в мембранных липидах эритроцитов длиннохвостых сусликов с наступлением и углублением гибернации увеличивалось. Также с наступлением гибернации и по мере её углубления отмечено снижение молярного соотношения холестерин-фосфолипиды, что согласуется с более низким содержанием холестерина в плазматических мембранах у спящих животных по сравнению с активными, как это было продемонстрировано на другом объекте [27]. Нами установлено, что

проницаемость для маркерных веществ (ионов $^{22}Na^{+}$ и $^{45}Ca^{2+}$, молекул ^{14}C-глюкозы и ^{3}H-инулина) монослойных липосом из суммарных липидов эритроцитарных мембран спящих сусликов, крысиных и донорских не отличается, что свидетельствует против существенной роли изменений свойств липидов в механизме холодовой резистентности клеток гибернирующих животных [16]. Очевидно, в основе механизма холодовой резистентности эритроцитов гибернаторов лежит реорганизация их мембранных белков с наступлением сезона гибернации, а в меньшей степени зависит от изменения липидов мембран, хотя такие изменения несомненно имеют место, так же, как и отличия в термотропных свойствах липидов из клеточных мембран гомойо- и гетеротермных животных.

Поскольку эритроциты сусликов, как известно, являются безъядерными клетками, способными осуществлять метаболизм лишь некоторых углеводов, можно было предположить, что модификация мембран связана с веществами белковой природы, присутствующими в плазме крови гибернирующих животных.

Для проверки вышесказанного предположения был проведен гель-электрофорез белков плазмы крови, полученной от животных в начале, середине и конце баута, а также от проснувшихся животных. Анализ электрофореграмм показал, что качественный состав белков в процессе баута и у проснувшихся животных практически не отличается.

Вместе с тем при исследовании методом радиоавтографии электрофореграмм C^{14}-меченых белков плазмы выяснилось, что в плазме крови животных, находящихся в начале баута, обнаруживается низкомолекулярный белок с молекулярной массой около 30 кДа, отсутствующий у проснувшихся животных (рис. 24). В середине и конце баута на радиоавтографиях заметны лишь следы этого белка, а у проснувшихся животных он вовсе не обнаруживается данным методом. Следует отметить, что пул меченых предшественников в плазме крови во всех изученных состояниях отличается незначительно и при сопоставлении с данными радиоавтографии электрофореграмма белков плазмы крови может указывать на связь синтеза обнаруженного синтезируемого *de novo*

белка с начальным периодом баута либо с периодом вхождения в него [8].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о стабилизации структуры мембран клеток, в частности эритроцитов сусликов в состоянии зимней спячки, направленной на поддержание их барьерной функции и ионного гомеостаза, которые обеспечиваются, по-видимому, наличием в плазме крови веществ, синтезируемых перед вхождением в зимнюю спячку или в самом начале баута.

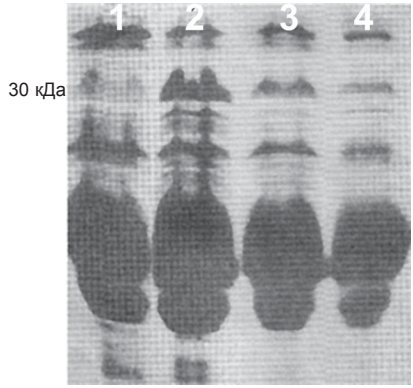


Рис. 24. Радиоавтография электрофореграммы белков плазмы крови, полученных из организма длиннохвостых сусликов: 1, 2, 3, 4 – в состоянии пробуждения, начале, середине и в конце баута соответственно.

Ранее был продемонстрирован гипометаболический и гипотермический эффекты плазмы крови [30], экстрактов тканей зимоспящих и холодоадаптированных животных [20, 39]. Среди результатов исследования биологической активности веществ, выделяемых из холодоадаптированных и зимоспящих животных, особенно важны данные о влиянии веществ, содержащихся в низкомолекулярной (1,3–2 кДа) фракции мозга и тонкой кишке гибернирующих сусликов (*Citellus undulatus*), на возбудимость миокардиальных волокон гомойотермных животных [21]. Полученные результаты показывают, что фракции веществ, выделенные из органов зимоспящих животных, обладают выраженными антиметаболическими и гипотермическими свойствами и способностью изменять проницаемость мембраны сердечных клеток. Введение этих фракций приводит к уменьшению транспорта ионов K^+ при потенциалах, близких к потенциалу покоя, блокировке Ca^{2+}- и Na^+-токов и увеличению K^+-тока при высоких потенциалах на мембране. Можно предположить, что среди веществ, содержащихся во фракции 1,3–2 кДа, содержатся компоненты, один (или одни)

из которых блокирует транспорт Ca^{2+}, а другой (или другие) – увеличивает длительность окончания фазы реполяризации. Поскольку практически все изменения ионной проницаемости, полученные в результате действия активных фракций, увеличивают устойчивость миокарда к аритмии и фибрилляции и способны вызвать уменьшение частоты сокращения сердца, можно предположить, что, по крайней мере частично, свойства миокарда зимоспящих связаны с присутствием в тканях физиологически активных соединений. В таком случае изменения ионного транспорта, вызываемые действием веществ, содержащихся в низкомолекулярных фракциях из тканей холодоадаптированных животных, могут играть также существенную роль при сохранении энергетических запасов, ионных градиентов и для сбалансированного подавления метаболизма у спящих животных.

Для анализа механизма кардиотропного действия фракции полипептидов 1–10 кДа из тканей гибернирующих и холодоадаптированных животных представляло интерес изучить ее влияние на кинетические параметры Са-транспортирующих систем в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов. Подходящим источником для получения фракции полипептидов 1–10 кДа является мозг лошади холодоадаптированной якутской породы, которая при сильном морозе (–30...–50°С) способна значительно снижать уровень метаболизма и входить в торпидное состояние. В результате исследования влияния различных концентраций фракции полипептидов 1–10 кДа мозга якутской лошади на скорость пассивного транспорта Ca^{2+} (нмоль/мг белка в мин) в везикулы сарколеммы крысиных кардиомиоцитов были получены данные, приведенные в табл. 7. При этом установлены следующие закономерности: для всех концентраций исследуемой фракции полипептидов 1–10 кДа при концентрации ионов Ca^{2+} от 0,1 до 1мМ скорость пассивного входа Ca^{2+} в везикулы несколько увеличивалась, а при концентрации Ca^{2+} в среде инкубации 3 ммоль/л, являющейся физиологической, регистрировали значительное уменьшение скорости транспорта при всех исследуемых концентрациях фракции полипептидов 1–10 кДа мозга якутской лошади [31].

При анализе представленных результатов (табл. 8) можно сделать заключение, что для всех концентраций (от 10^{-5} до 3×10^{-1} мг/мл)

Таблица 7. Влияние различных концентраций фракции 1–10 кДа из мозга якутской лошади на скорость пассивного транспорта Ca^{2+} в инвертированные везикулы сарколеммы кардиомиоцитов (M ± m)

Концентрация фракции 1–10 кДа, мг/мл	Скорость пассивного транспорта Ca^{2+}, нмоль/мг белка			
	I	II	III	IV
1×10^{-5}	2,26 ± 0,25	3,29 ± 0,47	10,50 ± 1,33	31,79 ± 4,48
1×10^{-4}	2,37 ± 0,42	3,92 ± 0,52	8,84 ± 1,33	29,58 ± 0,45*
1×10^{-3}	2,48 ± 0,56	3,40 ± 0,26	10,90 ± 0,14*	30,44 ± 0,19*
1×10^{-2}	2,63 ± 0,56	3,48 ± 0,49	10,03 ± 1,24*	29,00 ± 3,31*
3×10^{-2}	2,68 ± 0,38	4,11 ± 0,26*	11,39 ± 1,85*	26,02 ± 1,71*
3×10^{-1}	2,61 ± 0,34	4,53 ± 0,61*	11,89 ± 1,07*	24,89 ± 0,31*
1×10^{-1}	2,60 ± 0,38	4,33 ± 0,41*	11,03 ± 0,84*	25,54 ± 1,27*
Контроль (H_2O)	2,27 ± 0,18	3,19 ± 0,38	8,20 ± 0,49	32,00 ± 1,78

Примечания: Исходная концентрация Ca^{2+} в среде инкубации, мМ, составила: I – 0,1; II – 0, 5; III – 1,0; IV – 3,0; * – различия статистически значимы по отношению к контрольным показателям ($p \leq 0,05$).

исследуемой фракции полипептидов 1–10 кДа мозга якутской лошади при концентрации в среде Ca^{2+} от 1×10^{-7} до 3×10^{-6} М в реакции энергозависимого переноса величины скорости накопления Ca^{2+} превышали контрольные значения.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показывают, что фракция полипептидов 1–10 кДа, выделенная из мозга якутской лошади в зимний период, способствует понижению скорости пассивного транспорта Ca^{2+} и увеличению скорости активного транспорта Ca^{2+} в инвертированных везикулах сарколеммы кардиомиоцитов крыс при физиологической концентрации Ca^{2+} в инкубационной среде. Введение фракции в среду инкубации будет

Таблица 7. Влияние различных концентраций фракции 1–10 кДа из мозга якутской лошади на скорость пассивного транспорта Ca^{2+} в инвертированные везикулы сарколеммы кардиомиоцитов (M ± m)

Концентрация фракции 1–10 кДа, мг/мл	Скорость активного транспорта Ca^{2+}, нмоль/мг белка			
	I	II	III	IV
1×10^{-5}	2,78 ± 0,82	6,70 ± 0,71	6,83 ± 0,47	59,12 ± 7,78
1×10^{-4}	3,29 ± 0,35	6,84 ± 0,02	7,50 ± 1,38	63,47 ± 1,57*
1×10^{-3}	3,00 ± 0,02*	6,67 ± 0,43	6,78 ± 2,79	63,02 ± 8,24*
1×10^{-2}	3,33 ± 0,24*	6,80 ± 0,43	8,30 ± 0,33*	58,76 ± 5,03*
3×10^{-2}	3,40 ± 0,19*	7,46 ± 0,21*	8,46 ± 0,51*	71,99 ± 12,03*
3×10^{-1}	3,55 ± 0,08*	8,52 ± 0,50*	11,72 ± 3,07*	68,59 ± 6,55*
1×10^{-1}	2,81 ± 0,55	7,86 ± 0,27	11,00 ± 2,14*	67,83 ± 9,94*
Контроль (H_2O)	2,72 ± 0,22	6,57 ± 0,36	6,70 ± 0,03	49,61 ± 2,12

Примечания: Исходная концентрация Ca^{2+} в среде инкубации, мМ, составила: I – 0,1; II – 0, 5; III – 1,0; IV – 3,0; * – различия статистически значимы по отношению к контрольным показателям ($p \leq 0,05$).

приводить к понижению внутриклеточного содержания этого катиона в интактных кардиомиоцитах, где Ca^{2+} является одним из универсальных регуляторов возбудимости, сократительной активности и метаболизма мышечных клеток.

Собственные и литературные данные свидетельствуют о том, что при гибернации в различных тканях и органах животных происходят изменения структурно-функционального состояния биомембран, направленные на сохранение ионного гомеостаза. Этот процесс регулируется нейроэндокринной системой посредством поступающих в кровь как традиционных нейромедиаторов, так

и специфических для этого состояния веществ полипептидной природы. Изучение происхождения и роли этих веществ, их выделение в очищенном виде и искусственный синтез открывают перспективы управляемой гипотермии, а также создания новых нейро- и кардиотропных фармацевтических препаратов.

Проблема холодоустойчивости важна как в теоретическом, так и в практическом отношениях. Ей посвящено большое количество исследований, однако молекулярно-генетические механизмы холодоустойчивости до сих пор до конца не выяснены. Остаются также открытыми вопросы возникновения холодоустойчивости в процессе эволюции. В эволюции взаимоотношения между организмом и средой изменяются по двум направлениям: а) организм может быть относительно независимым от колебаний отдельных факторов среды (возникновение регуляторных или защитных механизмов); б) факторы среды, безразличные или даже вредные, могут создать необходимые условия развития (например, возникновение диапаузы у насекомых). В первом случае – это эврибионтность, а во втором – стенобионтность. Если вид дает несколько поколений в год и зимует, подвергаясь действию низкой температуры, отбор пойдет в направлении создания первого типа. Организмы должны обладать способностью развиваться как при охлаждении, так и без охлаждения. Охлаждение при этих условиях не может быть необходимым условием развития. Разделение животных на теплокровных и холоднокровных, как справедливо указывает ряд авторов, в определенной степени условно, так как температура тела холоднокровных нередко заметно превышает температуру окружающей среды, а температура тела теплокровных имеет суточные и сезонные колебания [33]. Более того, существуют многочисленные виды гомойотермных животных, занимающих промежуточное положение между теплокровными и холоднокровными и при резком снижении температуры окружающей среды впадающих в состояние дневного оцепенения (торпор) или зимней спячки (гибернация). Возможен и иной вариант. Животное дает одно поколение в год и подвергается в каждом поколении

систематическому воздействию пониженной температуры. Охлаждение является постоянным условием отбора и неизбежно будет превращаться в необходимое условие развития.

Приспособление к низким температурам неизбежно влечет за собой появление сложных биохимических и физиологических механизмов, обеспечивающих переключение организма на «зимний» режим существования. Как было показано, вследствие такой перестройки будут синтезироваться новые белки, изменится энергетический обмен, транспорт ионов и т. д. Установлено, что в ряде случаев у гетеротермов этот процесс регулируется низкомолекулярными соединениями, продуцирующимися в их тканях при подготовке к зимнему сезону. По-видимому, потребуется пройти еще достаточно долгий путь, прежде чем исследователи по-настоящему глубоко проникнут в тайны способности холодоустойчивых организмов выживать в экстремальных условиях внешней среды.

Литература

1. Аванов А. Л. Биологические антифризы и механизм их активности // Молекулярная биология.– 1990.– Т. 24, № 3.– С. 581–597.
2. Виноградова М. С. Функциональная морфология эпителиоцитов желудка в период зимней спячки // Механизмы зимней спячки. – Пущино, 1987. – С. 160–168.
3. Грищенко В.И., Гулевский А.К., Грищенкова Е.А. и др. Влияние фракции до 5 кДа из мозга холодоадаптированных рыб на жизнеспособность карася серебряного в условиях холодового стресса // Доповіді НАНУ. – 2009. – №11. – С. 155–159.
4. Гордон Р. Я., Бочарова Л. С, Попов В. И. и др. Структурно-функциональные основы метаболизма РНК в мозге зимнеспящих в период зимней спячки // Механизмы зимней спячки. – Пущино, 1987. – С. 168–175.
5. Гулевский А.К., Грищенкова Е.А., Релина Л.И. и др. Эффект повышения жизнеспособности карася серебряного в условиях холодового стресса под влиянием фракции до 5 кДа из мозга холодоадаптированных рыб // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2009. – №4. – С. 42–50.
6. Гулевский А.К., Грищенкова Е.А., Рязанцев В.В., Релина Л.И. Изменения в спектре белков личинок большого мучного хрущака (Tenebrio molitor) в период холодовой акклимации // Проблемы криобиологии. – 1995. – № 4. – С. 29–32.
7. Гулевский А.К., Грищенкова Е.А., Рязанцев В.В., Релина Л.И. Синтез белков и РНК в личинках большого мучного хрущака (Tenebrio molitor) при охлаждении и холодовой акклимации // Укр. биохим. журн. – 1996. – Т. 68, №1. – С. 88–91.
8. Гулевский А.К., Загнойко В.И., Щенявский И.И. и др. Особенности структурно-функционального состояния эритроцитов гомойотермных и гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – Т. 27, №4 . – 1991. – С. 432–436.

9. Гулевский А.К., Загнойко В.И., Щенявский И.И., Марковский А.Л. Ионный гомеостаз эритроцитов животных, находящихся в зимней спячке, в условиях гипотермии // Цитология. – 1990. – Т.32, №9. – С. 926–927.
10. Гулевский А.К., Релина Л.И. Стратегии холодоустойчивости беспозвоночных // Проблемы криобиологии. – 2011. – №3. – С. 239–250.
11. Гулевский А.К., Релина Л.И., Жегунова Е.Г. и др. Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного Carassius auratus gibelio // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №1. – С. 64–70.
12. Гулевский А.К., Релина Л.И., Погожих Е.Г. Белковый состав тканей карася серебряного в зависимости от сезона и температуры содержания // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, №5. – С. 93–99.
13. Гулевский А.К., Релина Л.И., Погожих Е.Г. Влияние времени года и температурного режима на спектр белков тканей карася серебряного Carassius auratus // Гидробиол. журн. – 2010. – Т. 46, №3. – С. 79–86.
14. Гулевский А.К., Щенявский И.И., Рязанцев В.В. Сезонные изменения транспорта одновалентных катионов в эритроцитах Citellus undulatus // Лечебная гипотермия: Сб. науч. трудов. – Харьков, 1992. – С. 82–85.
15. Гулевский А.К., Щенявский, И.И., Грищенко В.И. Сезонные модификации мембранных белков эритроцитов длиннохвостых сусликов // Доклады НАН Украины. – 1995. – №11. – С. 115–118.
16. Гулевский А.К., Щенявский И.И., Михалев О.И. Свойства липосом, полученных из суммарных липидов эритроцитарных мембран сусликов и крысы // Тезисы докл. 1-го съезда Укр. общества криобиологии и криомедицины. 18–20 октября 1995. – Харьков, 1995. – С. 63–64.
17. Загнойко В. И., Гулевский А. К., Миишева Д. Г. Синтез белка в органах длиннохвостых сусликов (Citellus undulatus) при различных функциональных состояниях // Изв. АН СССР. Сер. биологич. – 1989. – №6. – С. 862–869.
18. Загнойко В.И., Гулевский А.К., Щенявский И.И., Ильясова Е.И. Биосинтез суммарных белков и РНК в клетках печени длиннохвостых сусликов C. undulatus, находящихся в различных функциональных состояниях // Цитология. – 1991. – №10. – С. 89–93.
19. Загнойко В.И., Гулевский А.К, Щенявский И.И. и др. Структурно-функциональное состояние клеток крови гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Тезисы докладов симпозиума «Механизмы зимней спячки». – Махачкала, 1990. – С. 46.
20. Иваницкий Д. А., Колаева С. Г., Пастухов Ю. Ф. и др. Эффект выраженного снижения метаболизма у теплокровных эндогенными веществами из тканей зимоспящих в состоянии спячки // Докл. АН СССР. – 1982. – Т. 267, №2. – С. 978–990.
21. Кокоз Ю.М., Накимура О.В., Свиряев В.И. и др. Действие веществ, содержащихся во фракциях мозга и тонкой кишки гибернирующих сусликов (Citellus undulatus), на возбудимость миокардных волокон // Механизмы зимней спячки: Сб. науч. тр. – Пущино, 1987. – С. 146–159
22. Крамарова Л.И., Колаева С.Г., Сапожкова Г.Г и др. Нейропептиды и зимняя спячка // Эволюционные аспекты гипобиоза и зимней спячки: Сб. науч. тр. – Л.: Наука, 1986. – С. 89–92.
23. Лапинский А.Г., Невретдинова З.Г. О неспецифической модификации липидов мембран эритроцитов при гибернации у суслика Citellus undulatus // Журнал эволюц. биохимии и физиологии. – 1987. – Т. 23, №5. – С. 711–716.
24. Погожих О.Г. Структурные и метаболические особенности тканей карася серебряного Carassius auratus в условиях температурной акклимации: Дис… канд. биол. наук. – Харьков, 2010. –141 с.
25. Релина Л.И. Влияние низких температур на фенотипические признаки и белок-синтезирующий аппарат холодоустойчивых жуков Tenebrio molitor на разных стадиях развития: Дис… канд. биол. наук. – Харьков, 1999. – 91 с.
26. Щенявский И.И. Исследование механизмов холодоустойчивости эритроцитов длиннохвостых сусликов: Дис… канд. биол. наук. – Харьков, 1994. – 100 с.
27. Aloia R.C., Pengelley E.T. Bolen J.L. Changes in phospholipid composition in hibernating ground squirrel, Citellis lateralis, and their relationships to membrane function at reduced temperatures // Lipids. – 1974. – Vol. 9, №12. – P. 993–999.

28. Bale J.S. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2002. – Vol. 357, №1423. – P. 849–862.
29. Benga S., Holmes R. P. Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1984. – Vol. 43, №3. – P. 195–257.
30. Dawe A.R., Spurrier W. Hibernation induced in ground squirrels by blood transfussion // Science. – 1969. – Vol. 163, №3864. – P. 298–299.
31. Gulevsky A.K., Grischenko V.I., Tereschenko O.S., Zagnoiko V.I. The effect of a (1–10 kD) fraction of Yakut house brain on the kinetic parameters of Ca^{+}-transporting systems in cardiomyocyte sarcolemma vesicles // Cryoletters. – 1994. – Vol. ??, №1. – P. 27–32.
32. Gulevsky A.K., Relina L.I. A possible role of molecular chaperones in cold adaptation // Cryo–Letters. – 2003. – Vol. 24, №4. – P. 203–212.
33. Liu R.K., Walford R.L. The effect of lowered body temperature on lifespan and immune and non–immune processes // Gerontologia. – 1972. – Vol. 18, №5–6. – P. 363–388.
34. Renault D., Salin C., Vannier G. et al. Survival at low temperatures in insects: what is the ecological significance of the supercooling point? // CryoLetters. – 2002. – Vol. 23, №4. –P. 217–228.
35. Singer S. J., Nicolson S. E. The fluid mosaic model of the structure of cell // Science. – 1972. – Vol. 175, №4023. – P. 720–731.
36. Smith R. L., Oldfield E. Dynamic structure of membranes by deuterium NMR // Science. – 1984. – Vol. 225, №4659. – P. 280–288.
37. Storey K.B. Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles // Am. J. Physiol. – 1990. – Vol. 258, Vol. 3, Pt 2. – P. R559–R568.
38. Swan H., Reinhard F.G., Caprio D.L. et al. Hypometabolic brain peptide from vertebrates capable of torpor // Cryobiology. – 1981. – Vol. 18, №6. – P. 598 –602.
39. Swan H., Schatte C. Anti-metabolic extract from the brain of hibernating ground squirrel Citellus tridecemlineatus // Science. – 1977. – Vol. 195, №4273. – P. 84–85.
40. Vornanen M. Seasonal and temperature–induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts // Am. J. Physiol. – 1994. – Vol. 267, №6, Pt 2. – P. R1567–R1573.
41. Wilson F.R., Whitt G.S., Prosser C.L. Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme patterns in tissues of temperature-acclimated goldfish (Carassius auratus L.) // Comp. Biochem. Physiol. – 1973. – Vol. 46B. – P. 105–116.

Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°С в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования

Н.В. Репин*, Т.Н. Юрченко

Отдел криоморфологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: nvrepin@mail.ru*

Гипотермическое хранение представляет собой совокупность воздействий, где, помимо температуры, существенным фактором, оказывающим влияние на состояние биологических объектов, является также длительность экспозиции при пониженных, отличающихся от физиологической нормы температурных условиях. Внутренние защитные механизмы клетки способны обеспечить ее сохранность при кратковременном неблагоприятном воздействии, однако суммирование даже незначительных изменений во времени приводит к качественной трансформации структур клетки.

Важным моментом при изучении процессов холодового воздействия на клетки является исследование плазматических мембран как одного из наиболее криолабильных ее компонентов. Испытывая в процессе охлаждения или криоконсервирования действие многочисленных физико-химических факторов, клеточная мембрана в большей степени может быть подвержена структурным перестройкам, чем другие мембранные органеллы. Ключевая роль плазматической мембраны в функционировании клеток предполагает ее участие в приспособительных реакциях.

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 165–206.
© Н.В. Репин, Т.Н. Юрченко, 2012

Характер трансформации эритроцитов в зависимости от ионной силы и pH среды экспозиции

Эритроциты – удобный биологический объект для изучения механических свойств мембраны. Являясь в физиологических условиях двояковогнутыми дисками, их форма во многом зависит от физико-химических факторов среды экспозиции, оказывающих влияние на величину внутриклеточного pH и трансмембранного потенциала, протонизацию спектрина и изменение конформации трансмембранных белков [32, 33, 61, 67, 72, 73]. В результате изменения ионной силы и pH внешней среды нарушается ионный гомеостаз клетки, изменяются ее размер и форма [71].

При модификации физико-химических факторов среды экспозиции изменение формы клетки чаще всего происходит в течение секунд и обратимо при восстановлении физиологических условий [62]. Это позволяет предположить, что процесс является результатом нарушения слабых, нековалентных взаимодействий между структурными компонентами плазматической мембраны и цитоскелета.

Механизм трансформации можно объяснить изменением соотношения площадей двух монослоев мембраны при внедрении экзо- или эндогенных компонентов во внешний или внутренний слои липидного бислоя [71]. Так, с помощью производных ремантадина, имеющих различный заряд и встраивающихся, соответственно, в разные слои мембранного бислоя, показано, что увеличение площади внешнего липидного бислоя приводит к эффекту «положительной кривизны» – эхиноцитозу, а уменьшение – стоматоцитозу [22].

Существует несколько гипотез, в той или иной степени объясняющих механизм изменения эритроцитарной формы. Установлено, что анионный обменник – белок полосы 3 (БП3) – играет главную роль в поддержании эритроцитарной формы, по-

Используемые сокращения
БП3/-1.4/4.1/4.2/4.9 – белок полосы 3/ 1.4/4.1/4.2/4.9
ВМЧ – внутримембранные частицы
ГХ – гипотермическое хранение
РЭМ – растровая электронная микроскопия
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
ФБ – фосфатный буфер

скольку обладает свойствами, необходимыми для выполнения этой функций [37, 73]. Предложен механизм трансформации эритроцитов, при котором изменение соотношения цитоплазматического и трансмембранного доменов БП3 влияет на площадь соответствующего липидного монослоя, а также на сокращение или расслабление спектрина [70].

Однако множество механизмов изменения формы эритроцита, вызванного действием различных факторов, не могут быть объяснены в рамках какой-либо из существующих моделей-гипотез. В этой связи выяснение роли цитоскелет-мембранного комплекса в обеспечении адаптационных реакций клетки в ответ на экстремальные воздействия является важнейшей проблемой криобиологии.

Нами проведено исследование изменения формы эритроцитов, а также их целостности и осмотической устойчивости при моделировании изменений ионной силы и pH среды экспозиции, а также при длительном гипотермическом хранении.

Эксперименты выполнены на эритроцитах цельной донорской крови группы II (5 доноров), трижды отмытых от плазмы и форменных элементов раствором фосфатно-солевого буфера (130 мМ NaCl; 5,6 мМ глюкозы; 20 мМ фосфатного буфера (ФБ); pH 7,2) центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Клетки (20%-й гематокрит) смешивали со средой экспозиции в соотношении 1:10 и хранили 30 мин при комнатной температуре; 2 ч и 2–21 суток при 4°С в средах различного состава: электролитные – среда 1 (130 мМ NaCl; pH 5,4; 7,2; 8,6) и среда 2 (130 мМ KCl; pH 5,4; 7,2; 8,6); неэлектролитные (слабоэлектролитные) – среда 3 (260 мМ маннита; pH 5,4; 7,2; 8,6) и среда 4 (260 мМ сахарозы; pH 5,4; 7,2; 8,6). Все среды содержали 20 мМ ФБ.

Форму эритроцитов анализировали в растровом электронном микроскопе «РЭММА-101А» (АО «Selmi», Украина) при ускоряющем напряжении 20–30 кВ и увеличениях 1000–10000 крат. Прибор снабжен системой цифрового вывода изображения на монитор компьютера и программой обработки изображения (НКФ «SEO», Украина).

Степень морфологической гетерогенности эритроцитов оценивали методом проточной цитофлуориметрии на «FACS Calibur»

(«BD Biosciences», США) с одновременной раздельной фиксацией малоуглового и прямого светорассеяния. Анализировали параметр FSC, характеризующий форму клеток (соотношение двух проекций). Полученные данные обрабатывали с помощью программы «Win MDI 2.8». Осмолярность гипотонических сред контролировали осмометром «ОМКА-ИЦ-01». Спектры поглощения надосадочной жидкости регистрировали спектрофотометрически на длине волны 543 нм.

Анализ изменения формы эритроцитов методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) показал, что в средах, содержащих 130 мМ NaCl или KCl, эритроциты сохраняют форму двояковогнутого диска со средним размером 6,6–7,0 мкм при нейтральных значениях pH (рис.1) [16]. При кислых значениях pH наблюдаются незначительное набухание вогнутой части диска

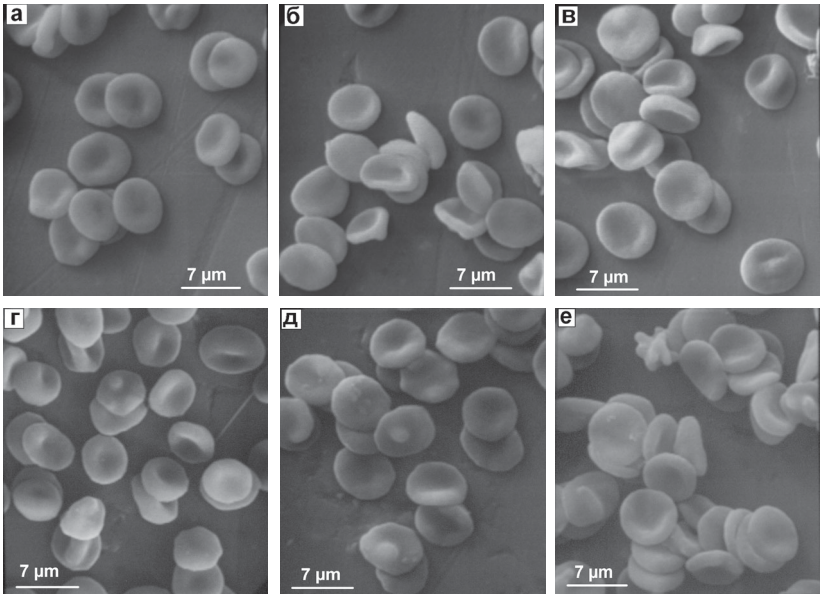


Рис. 1. Эритроциты после 30-минутной экспозиции при 20°С в электролитных средах, содержащих ФБ: а–в – среда 1 и г–е – среда 2, pH 5,4 (а, г); 7,2 (б, д); 8,6 (в, е).

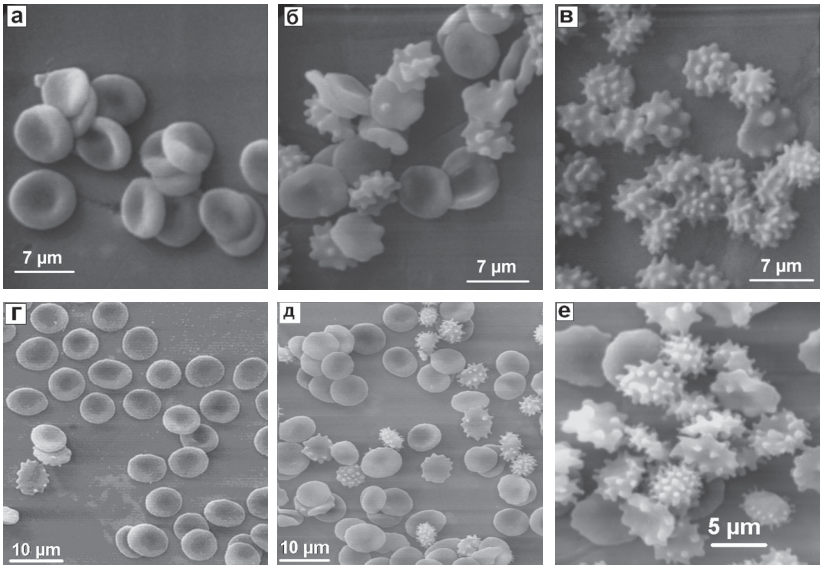


Рис. 2. Эритроциты после 30-минутной экспозиции при 20°С в неэлектролитных средах, содержащих ФБ: а–в – среда 3; г–е – среда 4, pH 5,4 (а, г); 7,2 (б, д); 8,6 (в, е).

и уменьшение размеров клеток до 5,8–6,2 мкм, а в среде KCl – образование клеток стоматоцитарной формы.

При щелочных значениях pH в средах с NaCl и KCl эритроциты принимали уплощенную дисковидную форму со средним размером 6,8–7,1 мкм (рис.1).

В неэлектролитных средах, содержащих 260 мМ сахарозы или маннита, при кислых и нейтральных значениях pH большинство клеток сохраняют форму дискоцитов и дискоэхиноцитов, а при щелочных – образуются их эхиноцитарные формы (рис. 2).

Аналогичные исследования были проведены с эритроцитами, в среде эквилибрации которых в качестве буферной смеси использовали Трис-HCl – буфер, содержащий непроникающую через мембрану эритроцита молекулу Трис. Отметим, что в этих условиях форма клеток изменялась незначительно. В средах, содержащих 130 мМ NaCl или KCl при всех значениях pH, выявлены

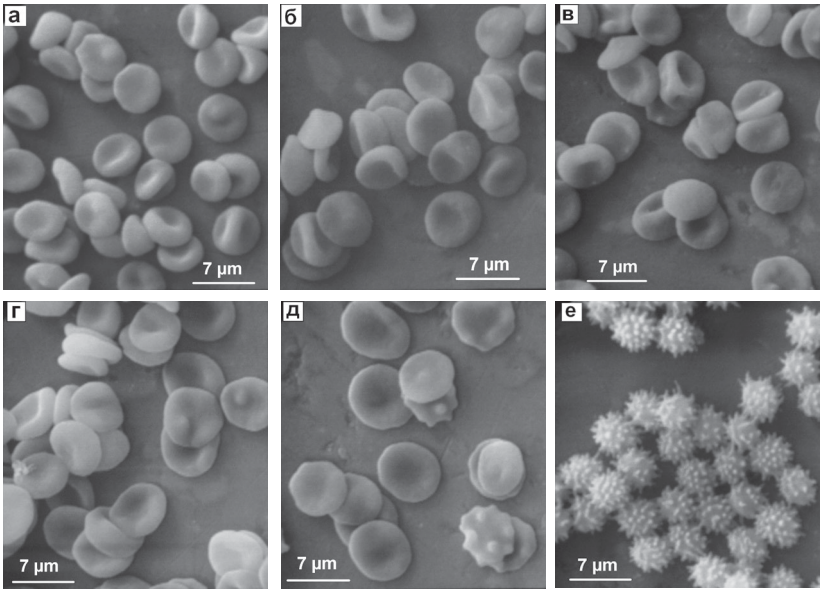


Рис. 3. Эритроциты после 30-минутной экспозиции при 20°С в электролитной (среда 1, а–в) и неэлектролитной (среда 3, г–е) средах, содержащих Трис-HCl буфер, при pH 5,4 (а, г); 7,2 (б, д); 8,6 (в, е).

незначительное уменьшение размеров клеток и набухание вогнутой части диска, а также увеличение количества клеток стоматоцитарной формы (рис. 3).

Для неэлектролитных сред при кислых и нейтральных значениях pH в трис-буферной среде характерны уплощение дискоидной формы клеток и незначительное увеличение их размеров до 7,0–7,2 мкм. Однако при pH 8,6 наблюдалась более интенсивная эхиноцитарная трансформация клеток с образованием сфероэхиноцитов с диаметром «остова» 4,6–5,1 мкм и содержанием большего (по сравнению со средой на ФБ) количества спикул (рис. 3).

Отмеченные выше трансформации эритроцитов подтверждаются величиной «морфологического индекса», вычисленного для эритроцитов в исследуемых экспериментальных условиях (рис. 4).

Представляло интерес определить связь между исходной формой эритроцитов и их устойчивостью к действию некоторых физико-химических факторов, в частности к действию осмотического фактора. С этой целью мы провели анализ состояния клеток после их экспозиции в средах с разной степенью гипотонии. Различие в длительности сохранения эритроцитами целостности в условиях гипотонии является общепринятым тестом их структурно-функционального состояния. Считается нормой, что свежевыделенные эритроциты, помещенные в гипотонические условия (90 мОсмоль), гемолизируют через 60 мин.

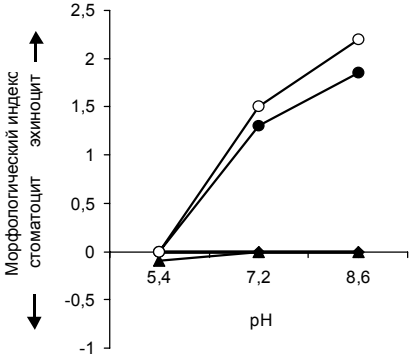


Рис. 4. Морфологический индекс формы эритроцитов после 30-минутной экспозиции в средах с различными значением pH и составом: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

Проведенные исследования показали, что степень чувствительности клеток к гипотонии (среда NaCl 90 и 140 мОсмоль) определяется составом и значением pH исходной среды эквилибрации (рис. 5). Максимальной осмотической устойчивостью к гипотонии (90 мОсмоль) обладали эритроциты, ранее находившиеся в неэлектролитных средах при щелочных значениях pH и имевшие эхиноцитарную форму. Уровень гипотонического лизиса в этом случае составлял 22,5–25%.

Наиболее чувствительными к снижению осмолярности внешней среды оказались клетки, перенесенные из электролитных (уровень гемолиза 85–100%) и неэлектролитных (уровень гемолиза 70–90%) сред при кислых значениях pH. При повышении осмолярности раствора NaCl до 140 мОсмоль чувствительными к гипотонии были клетки, предынкубированные в электролитных средах при кислых значениях pH.

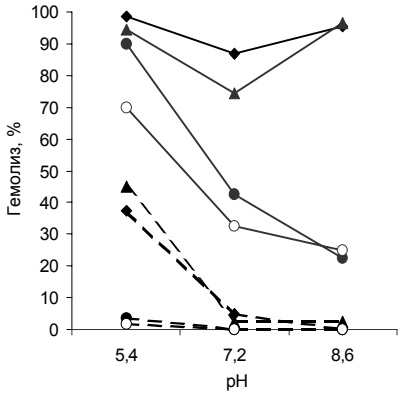


Рис. 5. Осмотическая резистентность эритроцитов в 90 (сплошная линия) и 140 мОсмоль (пунктирная линия) гипотонических средах NaCl после 30-минутной инкубации в средах с различными составом и значением pH: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

Существование взаимосвязи между формой клетки и ее осмотической устойчивостью иллюстрируют рис. 4 и 5. Величины морфологического индекса, представленные на рис. 4, свидетельствуют о том, что максимальное изменение формы (эхиноцит), отмеченное у эритроцитов в средах с низкой ионной силой при pH 8,6, соответствует максимуму осмотической устойчивости (рис. 5). При pH 5,4 наблюдались незначительное изменение формы в сторону стоматоцитов и снижение осмотической устойчивости. Для понимания причин отмеченных выше трансформаций клеток необходимо оценить вклад таких физико-химических факторов, как ионная сила и pH, а также их суммарное действие.

Сравнение формы клеток в неэлектролитных и электролитных средах при нейтральных pH (см. рис.1, 2) свидетельствует о незначительном увеличении количества эхиноцитарных форм в средах с низкой ионной силой. Это может быть обусловлено следующими причинами:

1) частичным выходом ионов K^+ и Cl^- по электрохимическому градиенту, что, как известно, вызывает появление эхиноцитарных форм [52];

2) существованием осмотического градиента непроникающего электролита, вызывающего обезвоживание [41]. При кислых значениях pH среда экспозиции существенно не влияла на форму клеток: наблюдалась лишь тенденция к их незначительному набуханию и появлению слабо стоматоцитарных форм (см. рис. 1, 2). Однако

при щелочных значениях pH фактор среды играл значительную роль – сохранял дискоидную форму в электролитных средах и способствовал образованию эхиноцитов в неэлектролитных.

Известно, при кислых значениях pH будет происходить вход в клетку ионов водорода по градиенту концентрации, что приводит к ингибированию выхода ионов K^+, Cl^- [27, 33, 72] и, как следствие, к повышению осмотического давления внутри клетки. Механизм ингибирования выхода ионов может быть также связан с изменением трансмембранного потенциала [38], поскольку при снижении электрического заряда гликокаликса уменьшается выход K^+ в средах с низкой ионной силой [52, 61]. В этих условиях происходит титрование ионами H^+ цитоскелет-мембранного комплекса, в том числе и спектрина, в результате которого изменяется его заряд, что может привести к «расслаблению» цитоскелета, изменению локальной кривизны мембраны и, как следствие, формы клетки [61, 35]. Именно этим можно объяснить наблюдаемые нами при кислых значениях pH набухание и появление стоматоцитарных форм эритроцитов, обладающих минимальной устойчивостью при переносе их в гипотонические среды.

При щелочных значениях pH избыток ионов гидроксила, помимо образования более отрицательного потенциала на мембране в неэлектролитных средах, будет способствовать выходу ионов K^+ и Cl^- из клетки по электрохимическому градиенту (сдвиг доннановского равновесия), снижению внутриклеточного осмотического давления и, как следствие этого, созданию предпосылок для образования эхиноцитов [61, 73]. Отмеченная максимальная устойчивость клеток при переносе в гипотонические среды может быть связана с внутриклеточной гипотонией, обусловленной снижением внутриклеточного осмотического давления и являющейся фактором адаптации клетки к внешней гипотонии. В электролитных средах при щелочных значениях pH присутствие в среде 130 мМ внеклеточных ионов Na^+ и Cl^- будет приводить, как минимум, к сохранению внутриклеточных ионов K^+ и Cl^-. Такое разное поведение клеток при щелочных значениях pH в зависимости от ионной силы, вероятно, связано с более отрицательным мембранным потенциалом в неэлектролитных средах [34, 38].

Таким образом, трансформация эритроцитов зависит от сочетанного действия ионной силы и pH среды экспозиции. При щелочных значениях pH фактор среды играет значительную роль: сохранение дискоидной формы в электролитных средах и образование эхиноцитов в неэлектролитных. При кислых значениях pH среда экспозиции не оказывала значимого влияния на изменение формы клеток: наблюдалась лишь тенденция к их незначительному набуханию и появлению слабо стоматоцитарных форм. Эритроциты в форме эхиноцитов обладают повышенной устойчивостью к действию осмотического фактора.

Значение факторов среды хранения в обеспечении устойчивости эритроцитов к длительной гипотермии

В последние годы много внимания уделялось подбору и разработке состава сред для гипотермического хранения (ГХ) эритроцитов. Установлено, что свою функциональную полноценность эритроциты сохраняют лишь в течение первых 3-х суток после забора крови [42]. При ГХ эритроцитов в них снижаются внутриклеточный pH и концентрация АТФ, повышается уровень свободного гемоглобина в надосадке, а также изменяются концентрация внутриклеточных ионов и структура мембраны, вплоть до формирования микровезикул [13, 40, 69].

Мы исследовали форму эритроцитов, ультраструктуру мембраны и состояние гликокаликса, их устойчивость к гипотоническому лизису при длительном ГХ в средах различной ионной силы и pH.

При переносе эритроцитов в среды с разными значениями pH установлена достаточно высокая сохранность их исходной формы практически до 2-х суток ГХ (рис. 6, а–в). Исключение составляли неэлектролитные среды с pH 8,6, в которых уже с 30-й минуты хранения наблюдались интенсивные процессы трансформации клеток в эхиноциты, а после 2-х суток – в сфероэхиноциты (рис. 6, г). Следует отметить, что по данным оптической микроскопии в любой эритроцитарной популяции в норме существует не менее 3–5% клеток с измененной формой. Однако результаты РЭМ свидетельствуют, что этот процент гораздо выше, поскольку даже микронарушение структуры и свойств мембраны уже приводят

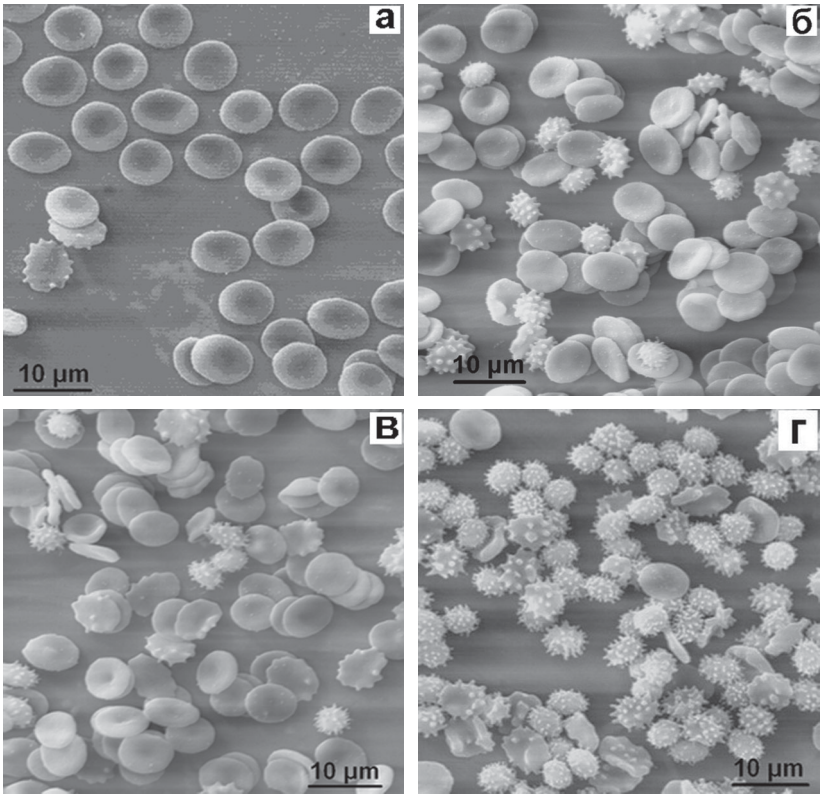


Рис. 6. Эритроциты после двух суток ГХ в зависимости от состава и pH среды экспозиции: а – среда 2 (pH 5,4); б – среда 2 (pH 8,6); в – среда 3 (pH 7,2); г – среда 3 (pH 8,6).

к изменению не только тонкой топографии поверхности, но и формы клетки в целом.

При анализе формы клеток мы исходили из того, что если факт изменения формы наблюдался не менее чем у 70% клеток, то эффект воздействия считался достоверным.

В процессе ГХ выявлены более выраженные изменения формы клеток в зависимости от состава и pH среды экспозиции. При

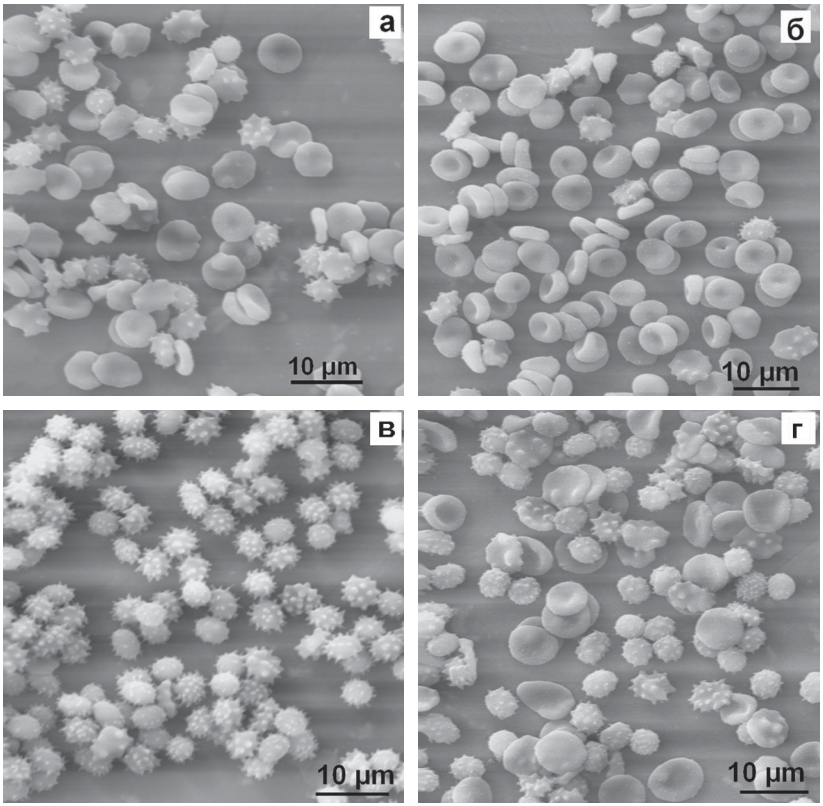


Рис. 7. Эритроциты после семи суток ГХ в электролитных средах и разных значениях pH среды: а – среда 1 (pH 5,4); б – среда 2 (pH 5,4); в – среда 1 (pH 7,2); г – среда 2 (pH 8,6).

кислых значениях pH в неэлектролитных средах и среде, содержащей NaCl, после семи суток ГХ наблюдалась гетерогенная популяция клеток, состоящая из дискоцитов и эхиноцитов (рис.7, а), тогда как в среде, содержащей KCl, практически все клетки трансформировались в слабо стоматоцитарные формы (рис.7, б). При нейтральных значениях pH в не- и электролитных средах после семи суток ГХ 90% клеток имели форму эхиноцитов (рис.7, в).

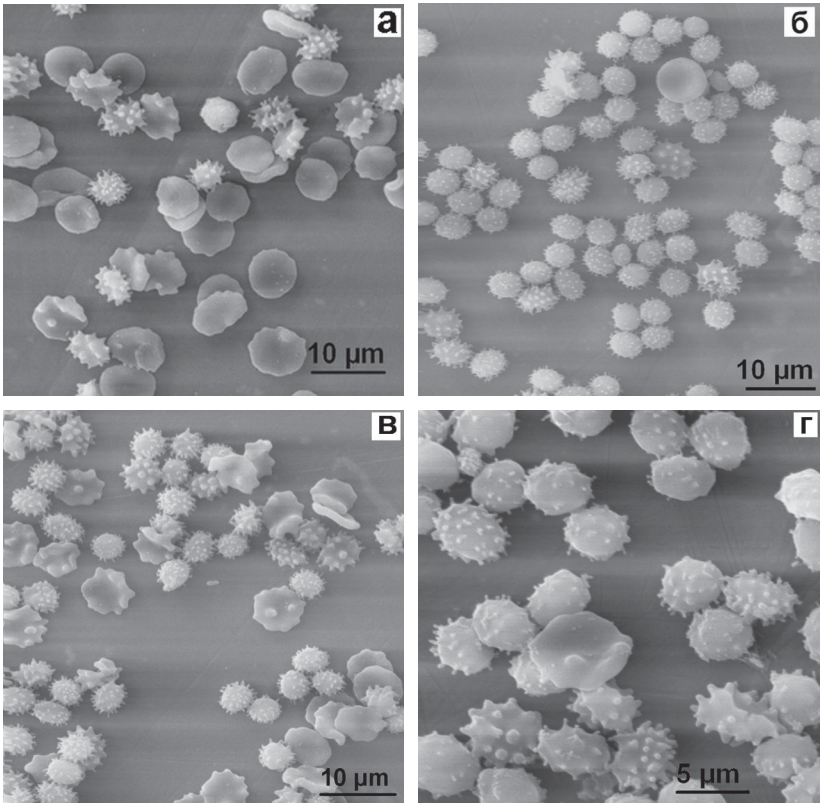


Рис. 8. Эритроциты после семи суток ГХ в неэлектролитных средах при разных pH среды экспозиции: а, б – среда 3 (pH 5,4 и 8,6 соответственно); в, г – среда 4 (pH 7,2 и 8,6 соответственно).

В средах с щелочным значением pH отмечена разная направленность трансформации эритроцитов в зависимости от ионной силы. В электролитных средах наблюдается образование гетерогенной популяции клеток, состоящей из уплощенных дискоидных форм и сфероэхиноцитов (рис.7, г), тогда как в неэлектролитных отмечено однонаправленное изменение формы клеток с образованием сфероэхиноцитов (рис. 8, б, г). Следует отметить, что после

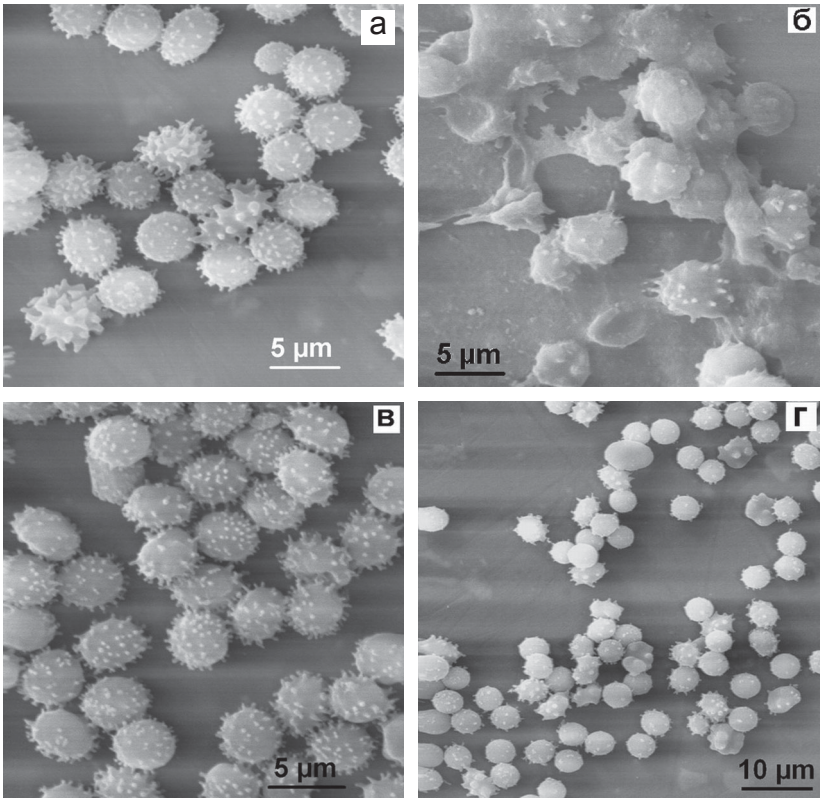


Рис. 9. Морфологическое состояние эритроцитов после 14 (а) и 21 (б–г) суток ГХ: а – среда 1 (pH 8,6); б – среда 2 (pH 8,6); в, г – среда 3 (pH 7,2 и 8,6 соответственно).

семи суток ГХ при щелочных pH образуются микровезикулы в средах обоих видов.

При увеличении сроков ГХ до 14 и 21 суток в NaCl- и KCl-содержащих средах при pH 5,4 наблюдается повреждение части клеток (о чем свидетельствует увеличение уровня гемолиза), а при pH 8,6 – тенденция к их слипанию (рис. 9, б). Сохранившиеся клетки трансформировались в сфероэхиноциты. В неэлектролитных средах

при pH 5,4 основную массу клеток составляли эхиноциты и дискоэхиноциты (рис. 9, а). При нейтральных и щелочных значениях pH в средах обоих видов после 21-х суток хранения доминировали сфероэхиноциты (рис. 9, в, г).

Используя метод проточной цитофлуориметрии, мы провели оценку состояния эритроцитов (n = 30 000 клеток) по параметру FSC, отражающему размер и форму клетки, в средах с разными значениями pH и ионной силы в процессе ГХ. Данный подход оказался эффективным для анализа формы клеток в процессе ГХ и позволил дополнительно подтвердить временной интервал изменения формы исследуемых клеток. Из данных рис. 10 видно, что в электролитных средах (среды 1 и 2; pH 5,4) эритроциты представлены гомогенной популяцией и имели примерно одинаковые размер и форму, что проявлялось практически в полном совпадении всех гистограмм (рис.10, а) и соответствовало данными РЭМ (см. рис. 7 и 8). Гистограммы, соответствующие значению pH 7,2, свидетельствуют о большей гетерогенности популяции эритроцитов до пяти суток хранения включительно, а после 7-х суток отмечается нивелирование второго максимума на FSC-гистограмме (рис.10, б – кривая 5). Это указывает на сближение размеров двух проекций клетки, что характерно для ее сфероэхиноцитарной формы (см. рис. 7, в)

При щелочных значениях pH в электролитных средах (рис. 10, в; среда 1) гистограммы после пяти суток имели вид, характерный

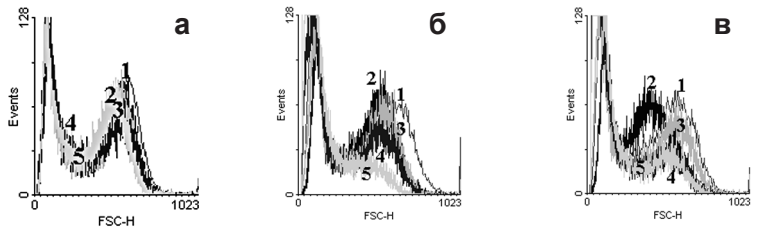


Рис. 10. Распределение эритроцитов при ГХ по параметру FSC в электролитных средах (среда 2) при разных значениях pH: а–в – среда KCl (pH 5,4; 7,2; 8,6 соответственно). Цифрами обозначены: 1 – контроль; 2 – 2 ч ГХ; 3 – 2 суток ГХ; 4 – 5 суток ГХ; 5 – 7 суток ГХ.

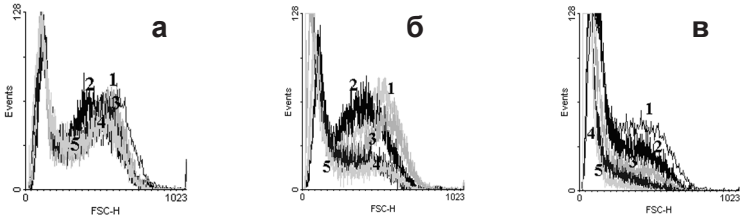


Рис. 11. Распределение эритроцитов по FSC-параметру при ГХ эритроцитов в неэлектролитных средах (среда 3) при разных значениях pH: а–в – среда 3 (pH 5,4; 7,2; 8,6 соответственно). Цифрами обозначены: 1 – контроль; 2 – 2 ч ГХ; 3 – 2 суток ГХ; 4 – 5 суток ГХ; 5 – 7 суток ГХ.

для гетерогенной популяции клеток (кривые 1–4), тогда как после 7 суток (кривая 5) увеличивалось количество эхиноцитарных форм.

По данным проточной цитофлуориметрии в средах с низкой ионной силой (среды 3 и 4), наблюдается иной характер изменения формы и размеров клеток при разных pH среды и длительности экспозиции (рис. 11). Однотипность и практически полное совпадение всех гистограмм распределения клеток при кислых и щелочных значениях pH в процессе хранения (рис. 11, кривые 1–5) свидетельствуют об устойчивом сохранении формы клеток в этих условиях в течение 7 суток и хорошо согласуется с данными РЭМ (см. рис. 7, 8).

При нейтральных значениях pH после пяти суток увеличивается количество эхиноцитарных форм, о чем свидетельствуют данные электронной микроскопии и резкое снижение интенсивности правого пика у 4-й и 5-й кривой гистограммы распределения (рис.11, б).

Анализ целостности клеток показал (рис. 12), что во всех исследуемых средах гемолиз отсутствовал первые 7 суток ГХ, исключая электролитные среды с кислым значением pH, в которых уровень гемолиза составлял 4–6%. После 14 суток отмечалось более выраженная зависимость гемолиза от значений pH среды. Максимальный повреждающий эффект оказывали среды с pH 5,4, в которых после 14 суток ГХ уровень гемолиза в электролитных средах составлял 17–20%, а в неэлектролитных – 6–10% (рис. 12). При pH 8,6

степень повреждения клеток была несколько ниже (11–14 и 5–6% для обоих видов сред соответственно). Минимальное повреждение клеток после 14 суток ГХ отмечено при pH 7,2 для обоих типов сред, у которых уровень гемолиза составлял 2–3 (неэлектролитные) и 7–8% (электролитные).

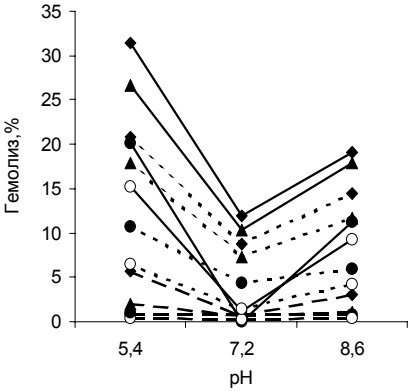


Рис. 12. Уровень гемолиза эритроцитов после 7-и (пунктирная линия), 14-и (пунктир-точки) и 21-х суток (сплошная линия) ГХ в зависимости от pH и состава среды инкубации: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

Отмеченная тенденция повреждения клеток в ходе ГХ в зависимости от состава и pH среды сохранялась и после 21-х суток хранения (рис. 12, сплошные линии). Уровень гемолиза при pH 7,2 был минимальным по сравнению с кислыми и щелочными значениями pH в средах как с высокой, так и низкой тоничностью. В электролитных средах после 21 суток гемолиз составлял 10–11%, а в неэлектролитных – 4–5%.

Одной из важнейших структурных составляющих мембраны является ее гликокаликс, который образуется отрицательно заряженными сиаловыми кислотами трансмембранных белков и который формирует поверхностный мембранный заряд. Считается, что заряд гликокаликса снижается при уменьшении pH среды [11]. Мы исследовали его состояние в процессе ГХ, используя специальный электронно-микроскопический фиксатор, который содержит рутений-красный, специфически связывающийся с сиаловыми кислотами белков мембран [2]. Установлено, что если в норме и после небольших сроков хранения структура гликокаликса представлена непрерывным примембранным слоем (рис. 13, а, б), то после 10–14 суток поверхность эритроцита содержит лишь его фрагменты (рис. 13, в) либо лишена их вовсе (рис. 13, г).

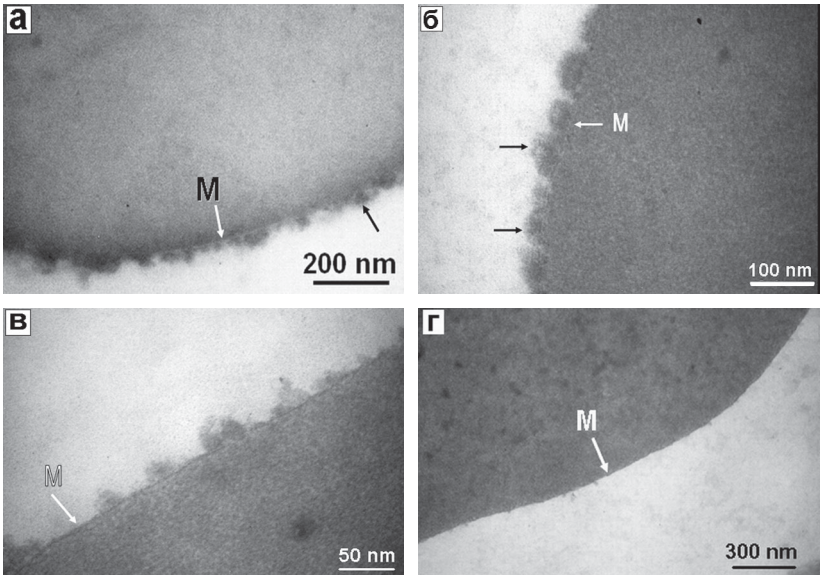


Рис. 13. Ультраструктура гликокаликса мембран эритроцитов после суток ГХ (а, б) и его деградация после 10–14 суток (в, г) в нейтральных pH (темные стрелки – гликокаликс; М – мембрана эритроцита). Фиксация рутением-красным.

Отмеченные выше изменения в структуре гликокаликса находят подтверждение в работе Ch. Godin [39], в которой показано, что после 6 суток хранения значительно снижается плотность заряда мембраны эритроцитов и уменьшается их электрофоретическая подвижность. Именно этим могут быть объяснены агрегация и слипание клеток, наблюдаемые нами при более длительных сроках ГХ (см. рис. 9, б).

Мы провели сравнительный анализ состояния структуры гликокаликса в электролитных и неэлектролитных средах при разных значениях pH в процессе ГХ. Представленные на рис. 14 данные иллюстрируют морфологическое состояние гликокаликса мембран эритроцитов донора после 7 суток ГХ. При щелочных значениях pH уже после 7 суток мембрана эритроцитов практически полностью лишена структуры гликокаликса у клеток, хранившихся

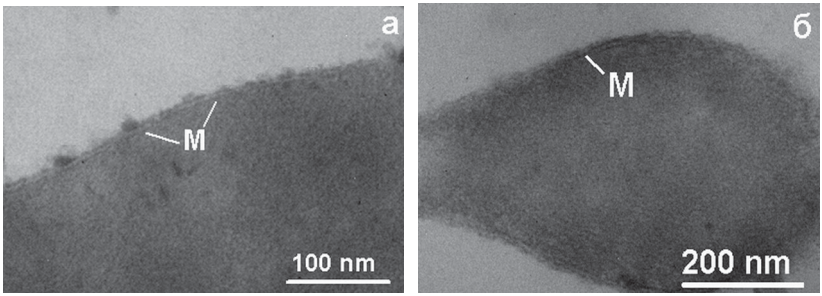


Рис.14. Состояние гликокаликса мембран эритроцитов после 7 суток ГХ в среде 2 при pH 8,6 (а) и среде 3 при pH 8,6 (б) (М - мембрана эритроцита). Фиксация рутением-красным.

в среде 3, и отмечаются его небольшие фрагменты у клеток в среде 2. Таким образом, изменение pH среды хранения оказывает более сильное влияние на состояние гликокаликса.

Для выявления латентных повреждений эритроцитов в процессе ГХ и объяснения механизма клеточных трансформаций проанализирована устойчивость различных форм эритроцитов к гипотонии. С этой целью образцы, хранившиеся в разных условиях, помещали на 60 мин в растворы NaCl разной тоничности (90, 140, 190 и 300 мОсмоль) при температуре 37°С после 10-кратного разбавления. Установлено, что эритроциты, хранившиеся в неэлектролитных средах, проявляют большую устойчивость к гипотонии (рис. 15). Следует отметить, что перенос клеток в изотонический раствор (300 мОсмоль) и нормотермию, во-первых, фактически моделирует условия трансфузии, а во-вторых, позволяет утверждать об отсутствии эффекта «запечатывания» поверхности мембраны непроникающими через мембрану сахарозой и маннитом.

При переносе эритроцитов в гипотонические растворы наиболее устойчивыми оказались клетки, хранившиеся в неэлектролитных средах, при всех значениях pH (рис. 15). В случае электролитных сред чувствительность клеток к гипотонии определялась значением pH среды экспозиции: более устойчивыми к действию осмотического фактора были клетки, хранившиеся при нейтральных значениях pH. Наиболее высокая степень повреждения клеток

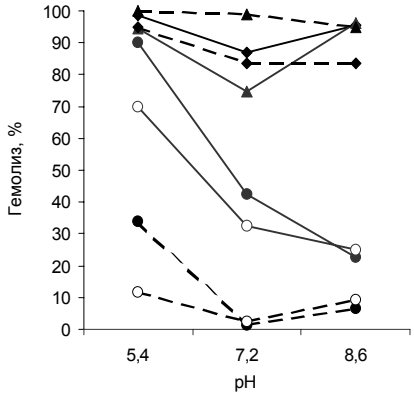


Рис. 15. Осмотическая резистентность эритроцитов в 90 мОсмоль NaCl после 30-минутной экспозиции при 20°С (сплошная линия) и после 7 суток ГХ (пунктирная линия) в зависимости от pH среды инкубации с разным ионным составом: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

отмечена после их переноса в гипотонию из среды, содержащей KCl, при pH 5,4.

Факт наибольшей устойчивости к гипотонии клеток, хранившихся 7 и более суток, по сравнению с 30-минутной экспозицией в средах с разным составом (рис. 15) подтверждается данными рис. 16. Величина морфологического индекса свидетельствует о том, что максимум «эхиноцитарности», отмеченный у эритроцитов во всех средах для значения pH 7,2 и в средах с низкой ионной силой при pH 8,6, соответствует минимуму повреждения (см. рис. 12) и максимуму осмотической устойчивости (рис. 15). Гетерогенная популяция (дискоциты, диско-эхиноциты и стоматоциты) в разных модификациях оказалась более чувствительной к действию осмотического фактора.

Выявленные нами два максимума – повреждения (в электролитных средах с pH 5,4) и сохранности (в неэлектролитных средах с pH 7,2) эритроцитов, соответствующих различным формам клеток, необходимо рассматривать с точки зрения взаимосвязи формы и ионного гомеостаза клетки при адаптации к изменяющимся условиям. Факт минимальной устойчивости эритроцитов в кислых средах при преимущественном сохранении их формы, с нашей точки зрения, связан с повышенным внутриклеточным осмотическим давлением за счет входа ионов H^+ и блокирования выхода ионов K^+ и Cl^- [32, 33, 52], а также с действием ионов H^+ на отрицательно заряженные компоненты цитоскелет-мембранного комплекса и мембранную проницаемость

[34]. Аналогичная точка зрения относительно увеличения количества внутриклеточных ионов хлора при низких pH, приводящего к изменению конформации БП3, изложена в работе P. Wong [71]. Предполагается, что происходящая в этих условиях протонизация внешнего домена БП3 вызывает изменение соотношения хлора между вне- и внутриклеточной средой, приводя к увеличению его концентрации внутри клетки. Корреляция между концентрацией внутриклеточного хлора и изменением формы при изменении pH клетки отмечена ранее [34, 36].

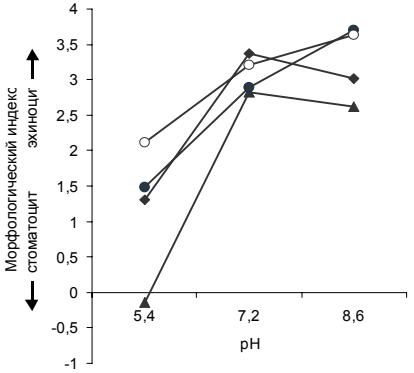


Рис. 16. Морфологический индекс формы эритроцитов после 7 суток ГХ в зависимости от pH и состава среды инкубации: ◆ – среда 1 (NaCl); ▲ – среда 2 (KCl); ● – среда 3 (маннит); ○ – среда 4 (сахароза).

Для проверки данного предположения и оценки состояния внутриклеточного калия мы провели анализ выхода ионов K^+ из эритроцитов в процессе их ГХ в средах, имеющих разные состав и значения pH (рис. 17).

Как следует из рис. 17, более быстрая потеря K^+ происходила в неэлектролитных средах. Для всех экспериментальных случаев максимум сохранности внутриклеточного калия наблюдался в средах с pH 5,4, при этом более высокий уровень его сохранности отмечен в электролитных средах.

В средах с pH 8,6 наблюдалась максимальная потеря ионов калия при сохранении различия его внутриклеточного уровня для электролитных и неэлектролитных сред. Данные рис. 17 позволяют также проследить зависимость потери ионов K^+ в процессе ГХ. Как и следовало ожидать, максимальная потеря K^+ происходила в течение первых суток при всех экспериментальных условиях, исключая натриевую среду при pH 5,4, для которой был характерен высокий (более 92%) уровень внутриклеточного K^+.

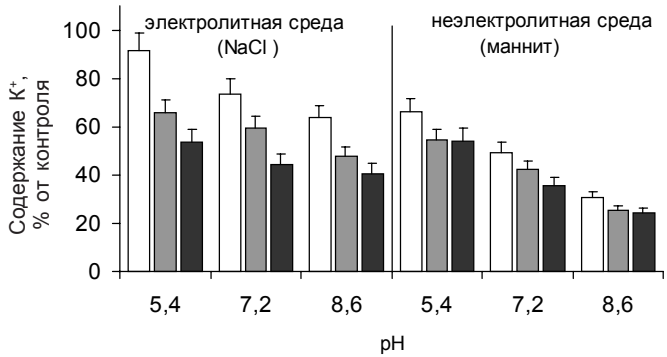


Рис. 17. Содержание внутриклеточного калия в эритроцитах в процессе ГХ (□ – 1-е; ▒ – 7-е; ■ – 14-е сутки) в электролитных и неэлектролитных средах с разными значениями pH.

Таким образом устойчивость к действию гипотонии клеток эхиноцитарных форм, хранившихся при щелочных pH в средах с низкой ионной силой, достаточно хорошо объясняется снижением внутриклеточного осмотического давления за счет выхода из клетки ионов K^+ и Cl^- по электрохимическому градиенту и приводящему к образованию эхиноцитов. В то же время происходящие в этих условиях морфологические изменения (сфероэхиноцитарная трансформация, изменение размеров клеток, потеря гликокаликса и образование везикул) позволяют сделать предположение, что они могут затрагивать, а по нашим результатам и затрагивают ультраструктурную организацию цитоскелет-мембранного комплекса.

Структурные перестройки в цитоскелет-мембранном комплексе при сфероэхиноцитарной трансформации. Механизм везикулообразования

Анализируя различные экспериментальные условия, в которых формируются сфероэхиноциты, содержащие различное количество спикул, мы обратили внимание на следующий факт. Как в случае тепловой (49,5°C) денатурации спектрина, так и при гипо-

термической экспозиции в средах с разным составом и значениями pH результатом трансформации эритроцита является образование везикул и сферического остова клетки (mother body) с диаметром 4,86 ± 0,48 мкм. Количественную оценку площади поверхности, теряемой эритроцитом в ходе данных морфологических изменений, мы провели с учетом следующих фактов:

– величину площади поверхности дискоцита в норме рассчитывают по его диаметру ($d_{ОМ}$ = 7,5 мкм), измеренному с помощью оптического микроскопа (ОМ). По данным ряда авторов площадь поверхности дискоцита составляет 130; 145, 163 мкм^2 [6, 10, 20];

– диаметр дискоцита, измеренный с помощью РЭМ, в среднем на 0,7 мкм меньше по сравнению с данными ОМ [8, 25] и составляет в среднем 6,75 мкм. Таким образом, площадь поверхности дискоцита $S_{РЭМ}$, рассчитанная по данным, полученным с помощью РЭМ, связана с «истинным» значением этого параметра $S_{ОМ}$, полученного из данных ОМ, следующим отношением: $S_{РЭМ}/S_{ОМ} \rightarrow d^2_{\text{РЭМ}}/d^2_{\text{ОМ}}$ и равна 0,8. Различие значений диаметра клеток в растровом и оптическом микроскопах обусловлено особенностями препарирования биообъектов для РЭМ.

Предполагая, что при трансформации дискоцита в сфероцит площадь поверхности эритроцита не изменяется, диаметр сфероцита $d_{сф}$ в ОМ для среднего значения поверхности (145 мкм^2) составляет примерно 6,8 мкм. В пересчете для РЭМ площадь поверхности дискоцита и диаметр сфероцита составляют примерно 115 мкм^2 и 6,05 мкм. Именно эти величины мы будем использовать в дальнейшем.

Потерю мембранного материала, вызванную «отшнуровыванием» от мембраны спикул и образованием везикул, нетрудно оценить, зная диаметр сфероэхиноцита после отслоения от него везикул: $S_{сфэх}/S_{сф} = d^2_{сфэх}/d^2_{сф} = (d_{сфэх}/d_{сф})^2$. Учитывая разброс значений диаметра остова, эта величина изменяется от 0,55 до 0,82 и составляет в среднем около 0,7. Индексы *сфэх* и *сф* обозначают сфероэхиноцит и сфероцит соответственно. Таким образом, в ходе сфероэхиноцитарной трансформации и везикуляции эритроцит может лишиться до 30% своей поверхности. Возникает вопрос,

что же в этой ситуации происходит с эритроцитом, мембраной и его внутренним содержимым, включая цитоскелет?

По данным литературы и результатам наших экспериментов установлено, что в процессе везикуляции мембраны наблюдаются следующие закономерности:

– отслоившиеся от мембраны везикулы не содержат элементов цитоскелета [53, 21] и, следовательно, при везикуляции происходит сжатие (уплотнение) цитоскелета внутри сферического остова (mother body);

– процесс везикуляции не приводит к существенному возрастанию уровня гемолиза в клеточной суспензии вне зависимости от причины, его вызывающей [14, 60];

– диаметр сфероподобного остова (4,5–5,5 мкм) практически не зависит от условий его образования (изменение состава среды и значений pH, нагрев до температуры термодинатурации спектрина или истощение по АТФ) [5, 15 60];

– мембранный скелет, связанный с внутренней поверхностью бислоя, в физиологических условиях растянут [6] и, следовательно, должен обладать тенденцией к сокращению.

Учитывая изложенное выше, мы исследовали структурные перестройки в цитоскелет-мембранном комплексе и механизм отслоения везикул от поверхности эритроцита при его сфероэхиноцитарной трансформации методами РЭМ и ТЭМ, а также замораживания-скалывания.

Проведенные исследования показали, что как в средах с различными составом и pH при ГХ, так и других условиях, вызывающих трансформацию клеток в сфероэхиноциты, существуют общие закономерности формирования спикул. На начальном этапе трансформации в структуре мембраны возникают «микровозмущения» в виде небольших с положительной кривизной возвышений на поверхности эритроцита (рис. 18, черные стрелки), свидетельствующие о локальном отслоении цитоскелета от мембраны, которое, вероятнее всего, вызвано сокращением спектриновой сети. Указанные возвышения размером 200–250 нм приблизительно соответствуют размеру элементарной ячейки цитоскелета [6, 65] и потенциально могут являться участками дальнейшего формирования

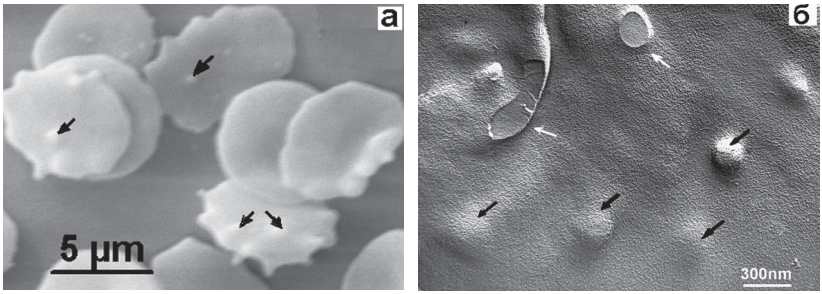


Рис. 18. Начальный этап формирования спикул на поверхности эритроцита по данным РЭМ (а) и замораживания-скалывания (б): а – 30-минутная экспозиция эритроцитов в сахарозной среде при pH 8,6; б – PF-поверхность мембраны эритроцита с характерным хаотическим распределением ВМЧ. На сколотой поверхности видны мембранные выросты, в виде небольших возвышений, положительной кривизны (черные стрелки) и спикулы со сколотыми верхушками (белые стрелки).

спикул. При этом в структуре мембраны наблюдается незначительное изменение в распределении трансмембранных белков (слабая агрегация внутримембранных частиц (ВМЧ) и уменьшение их плотности на вершине выроста; рис. 18, б), т. е. в этом случае есть все основания говорить о появлении в мембране структурно-нестабильных участков.

Пусковым механизмом изменений состояния цитоскелет-мембранного комплекса могут служить совершенно разные воздействия, например утечка ионов, вызванная изменением pH, снижение уровня АТФ, обезвоживание клеток и др. Длительное действие эхиноцитогенного фактора приводит к увеличению числа спикул на поверхности эритроцита (рис. 19) и завершается формированием сфероэхиноцитов (рис. 20). Разные количество спикул на поверхности клеток (рис.19, а, в), их структура (рис. 19, б, г), вероятнее всего связаны с возрастной и функциональной гетерогенностью клеточной популяции.

Завершается этап трансформации эритроцитов формированием сфероцитов, на поверхности которых либо имеются единичные спикулы (рис. 20, а, б), либо они отсутствуют полностью. В послед-

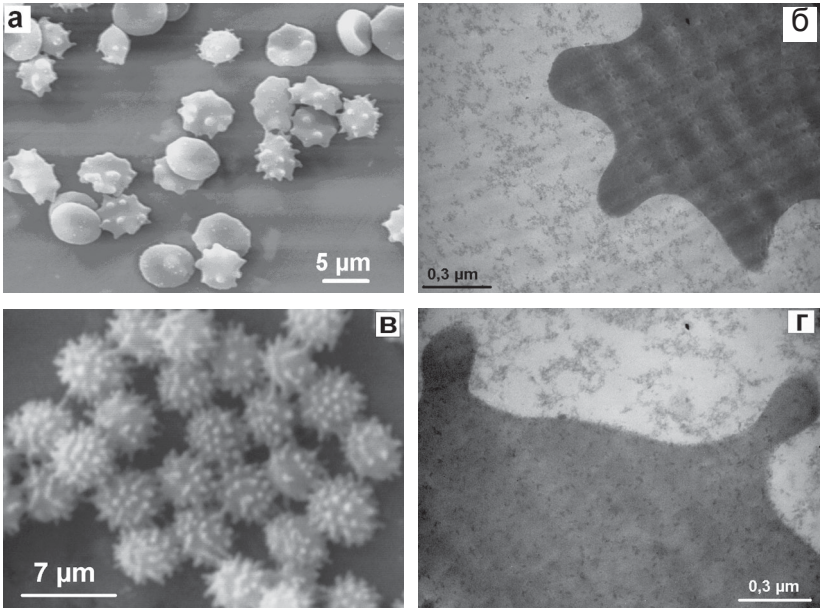


Рис. 19. Этап увеличения числа спикул на поверхности эритроцита, приводящий к формированию сфероэхиноцитов. Различие в числе спикул на поверхности клеток (а, в) и их ультраструктуре (б, г).

нем случае наблюдается остов сферической формы (mother body) диаметром от 4,5 до 5,5 мкм (рис. 20, б–г). Следует отметить, что размер и ультраструктура спикул и сфероэхиноцитов, анализируемых различными методами, существенно не отличаются. При всем кажущемся разнообразии форм спикул можно выделить три основные – коническую, цилиндрическую и булавовидную.

Формирование и отрыв спикул от клеточной поверхности в виде везикул происходят в несколько этапов. Возникая на поверхности клеток в виде конусообразного возвышения (см. рис. 18, а, б), спикулы удлиняются, оставаясь при этом устойчивой формой мембранных выростов (см. рис. 19, б, в).

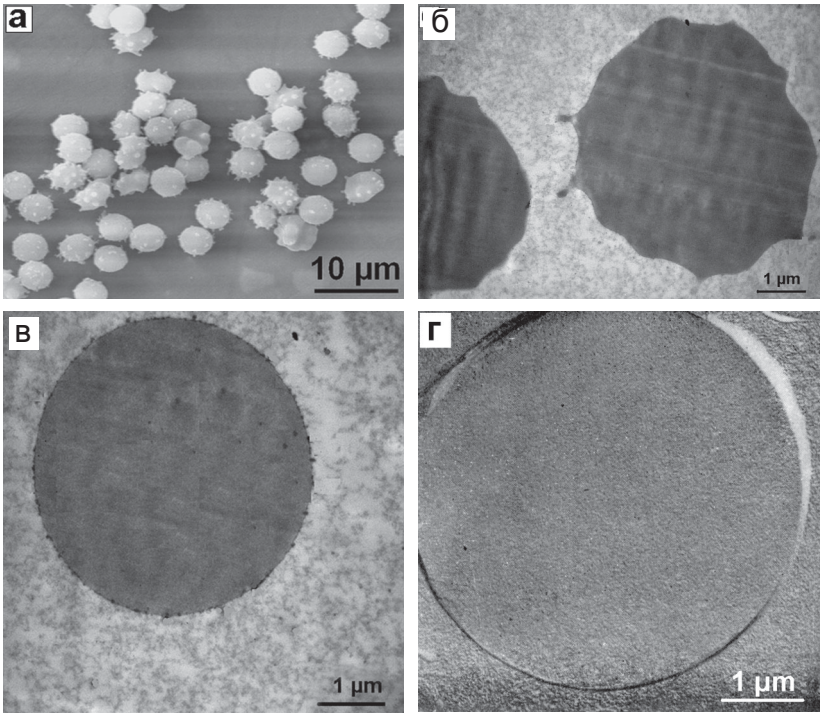


Рис. 20. Завершающий этап формирования спикул на поверхности сфероэхиноцитов (а, б) и их отсутствие у сфероцитов (в, г). Исследование методами РЭМ (а), ТЭМ (б, в) и замораживания-скалывания (г).

Дальнейшее влияние эхиноцитогенного фактора не только увеличивает число спикул, но и изменяет их геометрию: за счет уменьшения (сокращения) основания и утолщения верхушки конуса они приобретают цилиндрическую или булавовидную форму.

Данные рис. 21 и 22 иллюстрируют процесс отпочковывания везикул от мембраны эритроцита. Примерно на одной трети высоты спикулы от поверхности клетки возникает «перетяжка», проявляющаяся в локальном уменьшении диаметра и просветлении в этой области внутреннего содержимого спикулы (рис. 21, б,

короткие стрелки). Как показали проведенные измерения, диаметр спикул зависит от степени «эхиноцитарности» эритроцита. В случае эхиноцитов III и IV степеней кренирования (по принятой в литературе классификации [8, 25]) среднее значение диаметра спикул составляет 435 ± 43 и 257 ± 37 нм соответственно. В местах утончения диаметр поперечного сечения спикул уменьшается до 137 ± 25 нм.

Остовы клетки и спикулы имеют одинаковое трехслойное строение мембраны (рис. 21, б, вставка, длинная стрелка), что свидетельствует о наличии и в составе оболочки спикулы трансмембранных белков. В то же время в структуре оболочки (мембране) спикул и везикул наблюдаются участки с «потерей» непрерывности трехслойного строения (см. рис.14, б; 21, б), которые могут быть результатом локального перераспределения интегральных белковых компонентов мембраны (агрегация), что косвенно свидетельствует об отсутствии в них цитоскелета.

Завершающим этапом исследуемого процесса является отпочковывание от клетки мембранных везикул (рис. 22). В участке истончения тела спикулы (рис. 22, а) под влиянием различных внешних и внутренних воздействий (изменение осмотических параметров среды, тепловые флуктуации в мембране и т. п.) происходит отпочковывание от поверхности клетки сферических везикул с последующим замыканием мембраны клетки и оболочки

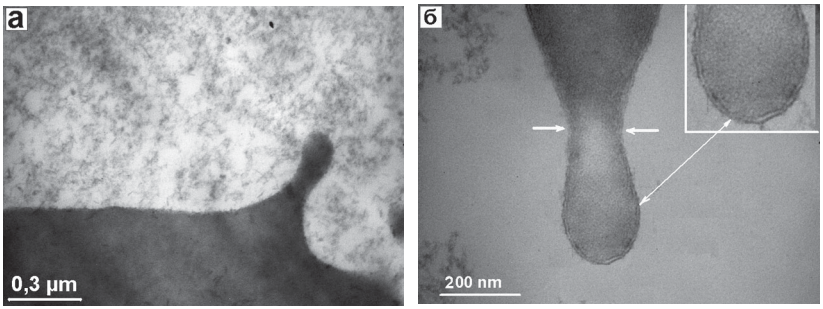


Рис. 21. Ультраструктура спикулы: а – фрагмент эритроцита со спикулой; б – спикула с характерным трехслойным строением мембраны (длинная стрелка); короткие стрелки – участок утончения тела спикулы.

везикулы (рис. 22, б). Отпочковавшиеся везикулы имеют округлую форму и в зависимости от степени «эхиноцитарности» эритроцита их размер составлял 495 ± 87 и 348 ± 65 нм для эхиноцитов III и IV степеней кренирования соответственно (рис. 22, а, б). Примерно такой же размер везикул получается, исходя из геометрических параметров спикул. Предположив, что от мембраны клетки отпочковывается фрагмент цилиндрической формы высотой 2/3 длины спикулы, то для спикул с диаметром поперечного сечения 200, 250, 300 и 430 нм диаметр везикул будет составлять 300, 340, 350 и 460 нм соответственно.

Зная средний размер отпочковавшихся от мембраны эритроцита везикул, можно оценить площадь мембраны, которую может потерять эритроцит в виде везикул при трансформации из сфероэхиноцита в сфероцит, подсчитав число спикул на поверхности сфероэхиноцита. С этой целью, используя метод РЭМ, мы определили площадь поверхности и количество спикул сфероэхиноцитов (рис. 23). Как видно из рис. 23, в направлении, указанном стрелкой, можно наблюдать спикулу, вершина которой находится в точке *б* за «линией горизонта» остова (точка *а*) на расстоянии *а–б*. Рассчитанная таким образом «невидимая поверхность» сфероэхиноцита, отсекаемая линией *X–X*, составляет примерно около одной трети от общей поверхности клетки. Количество спикул, наблюдаемое на поверхности сфероэхиноцитов, колеблется в пределах

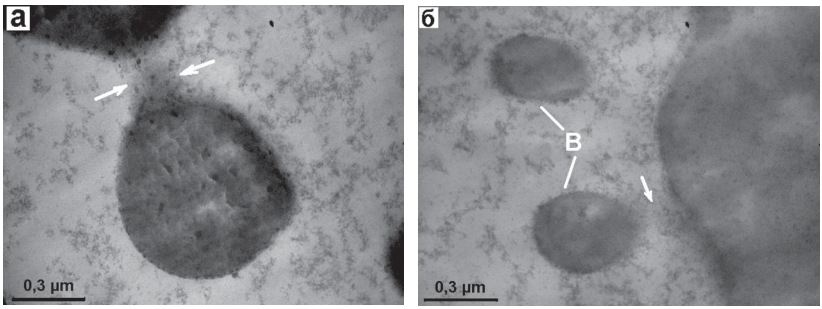


Рис. 22. Завершающий этап формирования спикул и образование везикул: а – истончение тела спикулы (стрелки); б – отпочковывание от клетки мембранных везикул (В).

от 35 до 89 на одну клетку и составляет в среднем 60 спикул (рис. 23). Такой разброс в количестве спикул может быть обусловлен неодинаковой потерей мембранного материала клетками с различным исходным функциональным статусом. Вычисленная таким образом суммарная площадь, теряемая при отпочковывании везикул от клетки, составляет примерно 15–20 % от исходной, что несколько меньше, чем указано выше.

Проведенная количественная оценка позволила определить:

– средний диаметр спикул (435 ± 43 и 257 ± 37 нм для эхиноцитов III и IV степеней кренирования соответственно);

– диаметр спикул в местах их утончения (137 ± 25 нм);

– размер отпочковавшихся везикул для эхиноцитов III и IV степеней кренирования (495 ± 87 и 348 ± 65 нм соответственно);

– количество спикул на поверхности сфероэхиноцитов (35–89 на одну клетку (в среднем 60 спикул).

В литературе обсуждаются возможные варианты перестроек в структуре мембраны при отщеплении мембранных везикул от клетки [5, 6, 28, 43, 66]. Считается, что этот процесс является проявлением необратимых изменений, которые приводят к потере жизнеспособности эритроцитов [47]. Очевидно, что отщепление везикул от клеток является лишь завершающим процессом сфероэхиноцитарной трансформации. Поэтому важно понять, какие условия инициируют структурные перестройки в мембране и цитоскелетном комплексе и предшествуют отщеплению везикул от

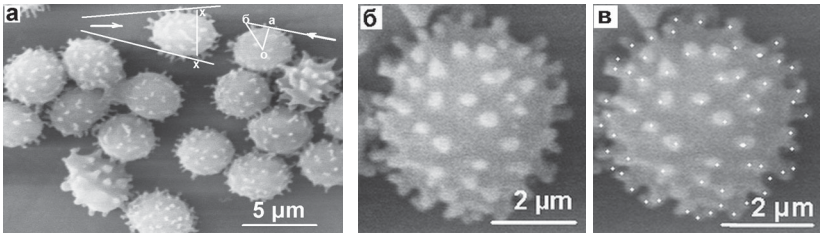


Рис. 23. Пример подсчета числа спикул на поверхности сфероэхиноцита: а – оценка соотношения видимой и «невидимой» поверхности сфероэхиноцита, наблюдаемого в РЭМ; б, в – число видимых спикул (белые точки) увеличивалось на треть при окончательном подсчете.

клеточной мембраны. Во-первых, структурно-функциональными составляющими, ответственными за такие перестройки, являются мембранный бислой, цитоскелет и активные метаболические процессы, обеспечивающие поддержание гомеостаза клетки. Во-вторых, бислой несжимаем [6] и, следовательно, уменьшение площади его поверхности возможно только в случае потери клеткой части мембранного материала. Кроме того, сравнение площади цитоскелета (30 мкм^2), полученной из теоретических расчетов, с площадью мембраны «тени» эритроцита, измеренной экспериментально (130 мкм^2) [51], свидетельствует о том, что площадь мембранного скелета, свободного от мембранного бислоя, существенно меньше, чем площадь мембраны «тени» эритроцита [45, 50]. Следовательно, скелет, связанный с внутренним монослоем мембраны, при физиологических условиях растянут и потенциально способен к самопроизвольному сокращению [6, 7, 46]. В результате возникает тенденция к изгибу мембраны и локальному изменению ее кривизны при сокращении спектрин-актиновой сети.

Таким образом, любые условия, которые вызывают сокращение спектриновой сети, инициируют локальное, положительного знака изменение спонтанной кривизны мембраны в виде выступов на ее поверхности и как следствие могут приводить к эхиноцитозу и формированию спикул. Подтверждением такого развития событий могут служить также следующие соображения. Различие в радиусе кривизны мембраны в области этих выступов и в ее остальной части обусловливает энергетически выгодные условия и инициирует латеральное перераспределение компонентов мембраны с большей по абсолютной величине спонтанной кривизной в область с меньшим значением кривизны (тело спикулы и прилежащие участки мембраны). В этом случае будет наблюдаться взаимосвязь между завершением процесса формирования спикулы и минимизацией возможного значения свободной энергии деформации мембраны, что является предпосылкой для «длительного и устойчивого» нахождения спикулы на поверхности клетки.

Энергетическое обеспечение процессов внутриклеточного гомеостаза (прежде всего ионного) и поддержание формы эритроцитов осуществляются за счет энергии гидролиза АТФ, образую-

щейся в процессе гликолиза и являющейся основным источником метаболической энергии в эритроцитах [64]. Истощение эритроцитов по АТФ приводит к ряду нарушений, в частности к прекращению работы ионных насосов и изменению ионного баланса в системе среда-клетка, модификации белков и липидов мембраны и дефосфорилированию спектрина [24, 26, 63, 64]. Это, вероятно, приводит к ослаблению взаимодействий и локальным нарушениям в спектрин-актиновой сети. Исследованию фосфорилирования в АТФ-зависимых изменениях формы эритроцитов уделяется много внимания [17, 44], поскольку этот процесс оказывает существенное влияние не только на структурное состояние белков цитоскелета, но и на характер их взаимодействия с заряженными фосфолипидами и интегральными белками мембраны [1].

Уровень фосфорилирования спектрина, БП-4.1, 4.2, 4.9 определяет эластичность белковой сети цитоскелета и соответственно способность эритроцитов к упругой деформации, а также форму клеток [54]. Об этом свидетельствуют и данные других авторов [55, 56], показывающие, что мембранная механическая стабильность регулируется фосфорилированием β-спектрина мембраносвязанной казеинкиназой I [18, 19, 58]. Известно также, что молекулы анкирина фосфорилируются в нескольких участках мембраны, включая спектрин-связующий домен. В результате фосфорилирования анкирина в 3-4 раза уменьшается его сродство к молекулам спектрина, организованного в тетрамеры, и в то же время не оказывает подобного эффекта на связывание анкирина со спектрином – димером [1, 53], а также ингибирует процесс ассоциации анкирина с цитоплазматическим доменом БП3. Таким образом, фосфорилирование белков скелета потенциально может влиять на физиологическую функцию нативной мембраны эритроцита.

Сфероэхиноциты и сфероциты обычно классифицируются как завершающие, предлитические стадии изменения формы эритроцита, что, на наш взгляд, нуждается в некотором уточнении. Сфероцит, образовавшийся из стоматоцита или дискоцита при помещении в гипотонический раствор и полностью сохранивший в количественном отношении состав мембраны, принципиально отличается от сфероцита, который образуется на завершающем этапе эхиноцитарной трансформации, сопровождаемой потерей

значительной части мембранного бислоя, и который имеет модифицированный за счет сокращения площади мембраны цитоскелет.

Об этом свидетельствуют представленные выше результаты относительно осмотической устойчивости эритроцитов различной формы при их помещении в раствор NaCl 90 мОсмоль (см. рис. 15). Эти данные иллюстрируют следующую особенность: эритроциты после 7 суток экспозиции в неэлектролитных средах в некоторых случаях обладали более высокой осмотической устойчивостью, чем свежевыделенные. Учитывая, что после 7 суток ГХ в неэлектролитных средах с нейтральными и щелочными значениями pH популяция эритроцитов представлена в основном эхиноцитами (pH 7,2) и сфероэхиноцитами (pH 8,6), можно предположить, что сфероэхиноциты и сфероциты, рассматриваемые обычно как предлитическое состояние клеток, проявляют более высокую осмотическую резистентность по сравнению с дискоцитами.

Этот факт можно было бы объяснить снижением внутриклеточного осмотического давления и созданием «внутриклеточной гипотонии» в результате выхода из клетки по электрохимическому градиенту ионов K^+ и Cl^-. Как показывают данные, полученные при измерении внутриклеточного содержания K^+ в процессе ГХ, при всех экспериментальных условий, кроме калий-содержащей среды 2, уровень внутриклеточного K^+ снижается (см. рис. 17). Выход катионов K^+ из эритроцитов и форма клеток напрямую не коррелируют. Действительно, наиболее существенная потеря ионов K^+ происходит в течение первых суток, а форма клеток за этот период практически не изменяется по сравнению с контролем, за исключением экспозиции клеток в неэлектролитных средах при pH 8,6.

Вероятно, устойчивость клеток к гипотонии может быть также связана со структурными изменениями в мембране и цитоскелете. Очевидно, потеря клеткой в ходе сфероэхиноцитарной трансформации до 30% и более поверхности липидного бислоя, содержащего интегральные белки, может существенно влиять не только на пластические свойства и устойчивость мембраны к гипотонии, но и на мембранную проницаемость.

Изучение латеральной и вращательной подвижности БП3 в мембране показало, что он может находиться в двух различных

состояниях. По данным ряда авторов в эритроците до 40% БП3 прочно связаны со спектриновой сетью мембраны и могут совершать только колебательные движения. Остальная часть (около 60 %) непрочно связана с цитоскелетом и способна к свободной латеральной диффузии в пределах элементарной ячейки цитоскелета [7, 68]. Это подтверждено результатами многочисленных ультраструктурных исследований мембраны, в которых показано, что внутримембранные частицы (ВМЧ – трансмембранные белки) в норме хаотически распределяются на сколотой поверхности мембраны эритроцита [12, 59] и скапливаются в агрегаты при денатурации спектрина [30, 31, 60].

Можно предположить, что именно эта, непрочно связанная с цитоскелетом и свободно диффундирующая часть трансмембранных («функциональных») белков участвует в формировании спикул. Прочно связанные с цитоскелетом («структурные») белки в основном участвуют в стабилизации формы клетки и отвечают за взаимодействие мембраны с цитоскелетом. Тот факт, что сфероэхиноциты и сфероциты проявляют более высокую устойчивость к гипотонии по сравнению с дискоцитами, вероятно, связан с потерей в составе везикул «функциональных» трансмембранных белков, обеспечивающих мембранную проницаемость. Оставшаяся часть «структурных» белков сохраняет достаточно высокую стабильность к различным воздействиям, в том числе к гипотонии и ГХ (рис. 24).

Ультраструктура мембран сфероцитов, образовавшихся в результате ГХ в течение 30 и 45 суток при pH 7,2, иллюстрирует, что трансмембранные белки, наблюдаемые в виде характерного, подобного сети распределения ВМЧ (рис. 24), свидетельствует о сохранении «структурных» белков мембраны и усилении их взаимодействия с белками цитоскелета.

Известно, что значительное уменьшение содержания свободно диффундирующего БП3 без снижения количества скелетно-связанного БП3 приводит к мембранной нестабильности. Подтверждением этому являются также данные о дестабилизации структуры цитоскелета и увеличении мембранной жидкостности в эритроцитах, для которых характерен частичный дефицит БП3 в мембране, наблюдаемый при сфероцитарной гемолитической анемии [31].

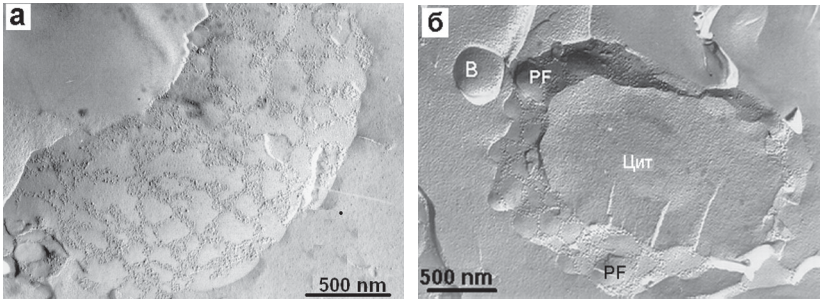


Рис. 24. Ультраструктура мембран эритроцитов после 30 (а) и 45 суток (б) ГХ. (Cyt – цитозоль; PF – внутренняя, прилежащая к цитоплазме поверхность скола с характерным распределением ВМЧ; В – везикула).

Существует несколько вариантов объяснения механизма формирования спикул и их отщепления от мембраны в виде везикул [5, 28]. По мнению В.А. Кириллова [5], участок поверхности мембраны, утративший связь со спектрин-актиновым каркасом, «отторгается» клеткой, а также, что выпячивание и отшнуровывание этого аномального мембранного участка может осуществляться в результате множественных разрывов и потери фрагментов цитоскелета, а также при участии сил гидростатического давления и поверхностного натяжения. Однако в работе Г.В. Гасс [3] подчеркивается, что разрыв даже нескольких связей в спектрин-актиновой сети уже может привести к образованию спикулы на поверхности эритроцита.

Мы считаем, что процесс отпочковывания везикул от мембраны клетки происходит не «посредством множественных разрывов и потери фрагментов цитоскелета» [5], а в результате локального его отслоения от мембраны и последующего сокращения (уплотнения) непрерывного цитоскелета (рис. 25).

Схематически это может выглядеть следующим образом. На участке мембранного бислоя с типичным распределением ВМЧ (рис. 25; этап 1) в процессе ГХ при снижении уровня АТФ и дефосфорилировании спектрина происходят локальное отслоение (провисание) и сокращение спектриновой сети, приводящие к локальному

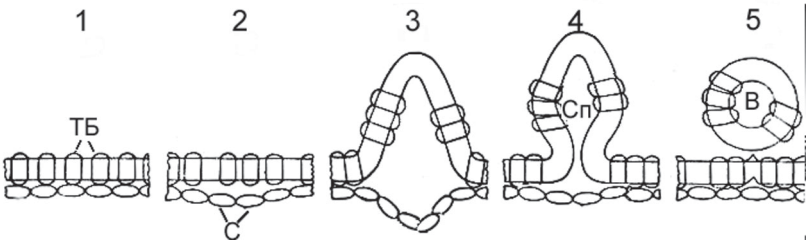


Рис. 25. Этапы (1-5) формирования и отпочковывания мембранных везикул. (ТБ – трансмембранные белки; Сп – спикула; С – молекулы спектрина; В – везикула)

«излишку» поверхности бислоя и формированию на нем мембранного выроста с положительной кривизной (рис. 25; этапы 2 и 3).

Отслоение скелета от мембраны приводит к появлению дополнительной свободы латерального перемещения трансмембранных белков и липидов, что проявляется в их агрегации. Дальнейшее метаболическое истощение эритроцитов вызывает еще большее сокращение спектриновой сети и выпячивание не связанных со спектриновым каркасом участков мембраны в виде спикул (рис. 25; этап 4), которые затем отпочковываются от поверхности клетки как сферические везикулы (рис. 25; этап 5). При этом происходит уплотнение цитоскелета (рис. 26).

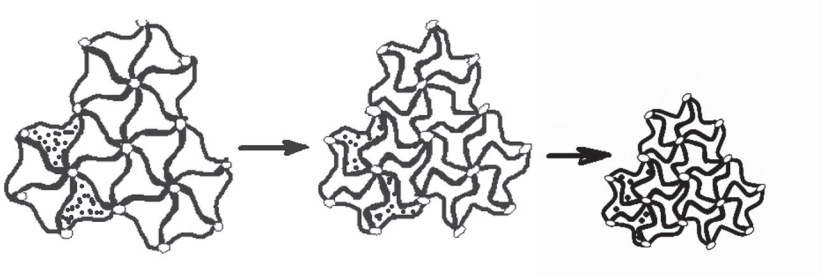


Рис. 26. Гипотетическая последовательность трансформации цитоскелета эритроцита (фрагмента) при переходе от дискоцита к сфероэхиноциту.

О такой трансформации цитоскелета эритроцита свидетельствуют имеющиеся экспериментальные факты.

Во-первых, методами электронной микроскопии при указанных выше трансформациях внутри эритроцитов не выявлены молекулы спектрина и тем более фрагменты цитоскелета, не ассоциированные с внутренней поверхностью мембраны клетки. Известно, что размер молекулы гемоглобина составляет 6,8 нм, а ее молекулярная масса – 64,5 кД [9]. Для спектрина в наиболее устойчивой димерной форме эти величины составляют 100 нм и 220–240 кД соответственно [20]. Такое 3–10-кратное различие указанных показателей для молекул спектрина по сравнению с молекулами гемоглобина не могло быть «не замечено» методами ТЭМ при условии, что фрагменты цитоскелета отщеплялись от внутренней поверхности мембраны эритроцита.

Во-вторых, если бы при ГХ происходила потеря элементов цитоскелета, то на гель-электрофореграммах наблюдалось либо уменьшение содержания БП-1.2 по отношению к БП3 или, по крайней мере, оно не изменялось. Экспериментальные данные свидетельствуют об обратном [21, 23].

В-третьих, поскольку белковый скелет не непрерывно, а точечно ассоциирован с мембраной, то наиболее вероятно, что трансформация поверхности клетки при сокращении скелета будет иметь локальный характер и проявляться в формировании спикул, основания которых сохраняют контакт с белковыми «якорями» скелета [50, 57]. С большой долей вероятности можно утверждать, что процесс везикуляции является циклическим и проявляется в чередовании фаз сокращения скелета, формировании и отщеплении везикул, а также замыкании бислоя мембраны.

Таким образом, полученные результаты в совокупности указывают на то, что происходящие при моделировании различных условий ГХ эритроцитов морфологические изменения (размеры и форма клеток, образование мембранных везикул и утрата клеткой гликокаликса, частичная потеря и агрегация трансмембранных белков) непосредственно затрагивают ультраструктурную организацию цитоскелет-мембранного комплекса.

Вопрос о влиянии параметров среды на образование везикул и повреждение эритроцитов при их гипотермическом хранении является важным, поскольку везикуляция, вероятно, является тем

процессом, который непосредственно может быть связан как с потерей эритроцитами их жизнеспособности, так и с их адаптацией к изменившимся условиям. Многочисленные данные свидетельствуют, что увеличение сроков ГХ эритроцитов путем подбора соответствующего состава среды, устранения «эффекта стекла» за счет использования для хранения пластиковых сосудов связано со снижением степени везикуляции эритроцитов [29, 48]. На морфологическом уровне существует корреляция между старением эритроцитов *in vivo* и процессами, вызывающими изменение эритроцитов *in vitro* при ГХ и сопровождающимися везикуляцией.

Изучение структурных перестроек в эритроцитах в условиях температурного воздействия и модификации состава среды показали, что наблюдаемые изменение формы и деформация плазматической мембраны, перестройки во внутриклеточном объеме и ряд других изменений указывают на участие в этих процессах не только липидного бислоя и белков мембраны, но и ионного состава, цитоскелетной сети, состояние которой в итоге посредством белок-белковых взаимодействий контролирует форму и объем клеток

В процессе ГХ (1–21 суток) в зависимости от ионной силы и pH среды эквилибрации наблюдается взаимосвязь между морфологическим состоянием клеток, их осмотической устойчивостью и степенью повреждения. При кислых значениях pH эритроциты трансформируются в гетерогенную популяцию дискоцитов и эхиноцитов вне зависимости от состава среды хранения, тогда как нейтральные значения pH вызывают трансформацию эритроцитов в гомогенную, эхиноцитарную популяцию. При щелочных значениях pH в неэлектролитных средах клетки уже на первые сутки ГХ интенсивно трансформируются в сфероэхиноциты, тогда как в электролитных образуется гетерогенная популяция дискоцитов и эхиноцитов.

Степень повреждения клеток в неэлектролитных средах в процессе ГХ является достоверно более низкой, а их осмотическая устойчивость более высокой по сравнению с повреждением в электролитных средах. Установлено, что вне зависимости от ионной силы среды при кислых значениях pH наблюдается минимальная осмотическая устойчивость эритроцитов. Наиболее устойчивой к действию факторов среды является эхиноцитарная форма клеток. Исследование состояния примембранного слоя эритроцитов в процессе ГХ показало, что между 10-ми и 14-ми сутками хранения про-

исходят разрыхление структуры гликокаликса, а при некоторых условиях его отслоение от мембраны в окружающий клетки раствор.

Максимальная потеря внутриклеточного K^+ происходит в течение первых суток ГХ эритроцитов при всех экспериментальных условиях, за исключением натриевой среды с pH 5,4, для которой отмечался высокий (92%) относительно контроля уровень содержания внутриклеточного K^+. В неэлектролитных средах наблюдалась более динамичная потеря внутриклеточного K^+. Выход K^+ из эритроцитов и их форма непосредственно не коррелируют между собой: максимум потери K^+ происходит в течение первых суток, а форма клеток в этот период остается на уровне контроля, за исключением неэлектролитных сред при pH 8,6.

В ходе сфероэхиноцитарной трансформации в результате отслоения везикул эритроцит теряет до 30% мембранной поверхности. Для эхиноцитов III и IV степеней кренирования диаметр спикул составляет 435 ± 43 и 257 ± 37 нм, а размер отпочковавшихся везикул – 495 ± 87 и 348 ± 65 нм соответственно. Диаметр спикул в местах их утончения составляет в среднем 137 ± 25 нм; количество спикул на поверхности сфероэхиноцитов колеблется в пределах от 35 до 89 на одну клетку (в среднем 60 спикул).

Авторы благодарят сотрудников Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины к.б.н., ст.н.с. отдела биохимии и фармакологии нейрогуморальных систем Кирошку В.В. за помощь в проведении экспериментов и анализе результатов; к.б.н., ст.н.с. отдела криоцитологии Зубова П.М. за методическое обеспечение исследований методом проточной цитофлуориметрии.

Литература

1. Батрукова М.А., Бетин В.Л., Рубцов А.М., Лопина О.Д. Анкирин: строение, свойства и функции // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 4, – С. 469–484.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия . – М.: Мир, 1974. – 488 с.
3. Гасс Г. В., Марголис Л.Б., Черномордик Л.В. Локальные деформации мембран эритроцитов в переменном электрическом поле // Биол. мембраны. – 1990. – Т. 7, №6. – С. 647–658.
4. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // Успехи физиолог. наук.– 2001. – Т. 32, №3. – С. 66–78.

5. Кириллов В.А., Вотяков В. Л., Конев С. В. Изучение процесса АТФ-истощения эритроцитов человека с помощью метода криоскалывания // Цитология.– 1987. – Т. XXIX, №11. – С. 1245–1249.
6. Козлов М.М., Маркин В.С. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель // Биол. мембраны. – 1986. – Т. 3, №4. – С. 404–422.
7. Козлов М. М., Черномордик Л. В., Маркин В. С. Механизм образования безбелковых участков мембраны: разрыв мембранного скелета // Биол. мембраны. – 1989. – Т. 6, №6. – С. 597–611.
8. Крымский Л. Д., Нестайко Г. Д., Рыбалов А. Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. – М.: Медицина, 1976. – 165 с.
9. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки. – М.: Мир, 1974. – 958 с.
10. Петренко Ю.М., Владимиров Ю.А. Изменение размеров эритроцитов при набухании в гипоосмотических средах // Биофизика. – 1987. – Т. 32, №3. – С. 448–453.
11. Петренко Ю. М., Владимиров Ю. А. Роль поверхностных зарядов в поддержании осмотической резистентности эритроцитов // Гематология и трансфузиология. – 1987. – №10. – С. 15–18.
12. Репин Н.В., Репина С.В. Ультраструктурные и динамические характеристики мембран эритроцитов. Влияние физиологического состояния и температуры // Цитология. – 1990.– Т. 2, №11. – С. 1094–1098.
13. Репин Н. В., Кирошка В.В. Значение факторов среды хранения в обеспечении устойчивости эритроцитов к длительной гипотермии // Биофизика живой клетки. – 2008. – Т. 9. – С. 108–109.
14. Репин Н.В., Кирошка В.В. Морфофункциональное состояние эритроцитов при длительном гипотермическом хранении в зависимости от pH и ионной силы // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 179.
15. Репин Н. В., Кирошка В. В., Головко О. И. Анализ морфологии эритроцитов и их устойчивости в зависимости от pH и ионной силы среды в условиях гипотермического хранения // Проблемы криобиол. – 2009. – Т. 19, №1. – С. 10–17.
16. Репин Н. В., Кирошка В. В. Характер трансформации формы эритроцитов в зависимости от ионной силы и pH среды экспозиции // Укр. журнал гематології та трансфузіології. – 2009. – №2. – С. 27–31.
17. Слобожанина Е. И., Черницкий Е. А., Козлова Н. М. Содержание внутриклеточного АТФ и структурное состояние белков в эритроцитарной мембране // Биофизика. – 1982. – Т. 27, №3. – С. 425–429.
18. Сторожок С. А., Санников А. Г., Белкин А. В. Зависимость стабильности и деформабильности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета // Научный вестник ТГУ. – 1996. – Т. 1. – С. 8–15;
19. Сторожок С. А., Санников А. Г., Захаров Ю. М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. – Тюмень: Изд-во Тюменского ун–та, 1997. – 140 с.
20. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функция эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
21. Черницкий Е. А., Федорович И. Е., Слобожанина Е. И. Везикуляция и изменение мембранных белков эритроцитов в процессе хранения консервированной крови и эритроцитной массы при 4°С // Гематология и трансфузиология.– 1993.– Т. 38, №8.– С. 18–21.
22. Черный В.В., Пауличке М. Влияние амфифильных молекул на форму эритроцитов // Биологические мембраны .– 1990 .– Т.7, №8 .– С. 838–842
23. Allan D., Limbrick A. R., Thomas P., Westermant M. P. Microvesicles from sickle erythrocytes and their relation to irreversible sickling // Br. J. Haematol. – 1981. – Vol. 47, №3. – P. 383–390.
24. Anderson J. M., Tyler J. M. State of spectrin phosphorylation does not affect erythrocyte shape or spectrin binding to erythrocyte membranes // J. Biol. Chem. – 1980. – Vol. 255, №4. – P. 1259–1265.
25. Bessis M. Living blood cells and their ultrastructure. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1973. – P. 140–175.
26. Birchmeier W., Singer S. J. On the mechanism of ATP-induced shape change in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP // J. Cell Biol. – 1977. – Vol. 73. – P. 647–659.
27. Bisognano J.D., Dix J. A., Pratap P.R., et al. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // J. Gen. Physiol. – 1993. – Vol. 102, №1. – P. 99–123.

28. Božic B., Kralj-Iglic V., Svetina S. et al. Coupling between vesicle shape and lateral distribution of mobile membrane inclusions// Physical Review E.– 2006.– Vol. 73, №4, Pt. 1. – P. 041915(1–11).
29. d'Almeida M. S., Jagger J., Duggan M. et al. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion // Transfus. Med.– 2000.– Vol. 10, №4.– P. 291–303.
30. Elgsaeter A.A., Stokke B.T., Mikkelsen A., Branton D. The molecular basis of the erythrocyte shape // Science.– 1986.– Vol. 234, №4781. – P. 1217–1223.
31. Ferretti G., Tangorra A., Curatola G. Effects of intramembrane particle aggregation on erythrocyte membrane fluidity: an electron spin resonance study in normal and in dystrophic subjects // Exp. Cell Res.– 1990.– Vol. 191, №1. – P. 14–21.
32. Gedde M. M., Yang E., Huestis W. H. Shape response of human to altered cell pH // Blood. – 1995. – Vol. 86, №4. – P. 1595–1599.
33. Gedde M. M., Davis D. K., Huestis W. H. Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape // Biophys. J. – 1997. – Vol. 72, №3. – P. 1234–1246.
34. Gedde M. M., Huestis W. H. Membrane potential and human erythrocyte shape // Biophys. J. – 1997. – Vol. 72, №3. – P. 1220–1233.
35. Gerald Lim H. W., Wortis M. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics // Cell Biol. – 2002.– Vol. 99, №26. – P. 16766–16769.
36. Gimsa J., Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // Mol. Membr. Biol. – 1995. – Vol. 12, №3. – P. 247–254.
37. Gimsa J. A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape // Biophys. J. – 1998. – Vol. 75, Issue 1. – P. 568–569.
38. Glaser R. Does the transmembrane potential ($\Delta\psi$) or the intracellular pH (pHi) control the shape of human erythrocytes? // Biophys. J.– 1998. – Vol. 75, Issue 1. – P. 569–570.
39. Godin Ch., Caprani A. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity // Eur. Biophys. J. – 1997. – Vol. 26, №2. – P. 175–182.
40. Hess J. R., Rugg N., Knapp A. D. et al. The role of electrolytes and pH in RBC ASs // Transfusion. – 2001. – Vol. 41, №8. – P. 1045–1051.
41. Hoffman J. F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells // Blood Cells. – 1987. – Vol. 12, №3. –P. 565–588.
42. Högman C. F., Löf H., Meryman H. T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate // Transfusion. – 2006. – Vol. 46, №9. – P. 1543–1552.
43. Iglic A., Veranic P., Jezernik K. at al. Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocyte// Bioelectrochemistry. – 2004. – Vol. 62, №2. – P. 159–161.
44. Jinbu Y., Nakao M., Otsuha M., Sato Sh. To steps in ATP-dependent shape change of human erythrocyte ghosts // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1983. – Vol. 112, №2. – P. 384.
45. Johnson R.M., Taylor G., Meyer D.B. Shape and volume changes in erythrocyte ghosts and spectrin-actin networks // J. Cell Biol. – 1980.– Vol.86, №2.– P. 371–376.
46. Kozlov M. M., Markin V.S. Model of red blood cell membrane skeleton: electrical and mechanical properties // J. Theor. Biol. – 1987. – Vol. 129, №4. – P. 439–452.
47. Kralj-Iglic V., Svetina S. and Zeks B. Shapes of bilayer vesicles with membrane embedded molecules // Eur. Biophys. J. – 1996. – Vol. 24, №5. – P. 311–321.
48. Kriebardis A. G., Antonelou M.H.,. Stamoulis K.E. et al. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells // J. Cell. Mol. Med. – 2007. – Vol. 11, №1. – P. 148–155.
49. Lange J., Gough A., Steck T.Z. Role of the bilayer in the shape of the isolated erythrocyte membrane // J. Membrane Biol. – 1982. – Vol. 69, №2. – P. 113–124
50. Lange Y., Hadesman R.A., Steck T.L. Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane // J. Cell. Biol. – 1982.– Vol. 92, №3. – P. 714–722
51. Lerche D., Jucobasch G., Meier W., Megow D. Mechanical membrane properties of human red blood cells and their change due to metabolic disturbance // Biomed. Biochim. Acta. – 1983. – Vol. 42, №11. – P. 112–116.

52. Liu S. Q., Law F. Y., Knauf P. A. Effects of external pH or substrate binding and on the inward chloride translocation rate constant of band 3 // J. Gen. Physiol. – 1996. – Vol. 107, №2 – P. 271–291.
53. Lutz H. U., Liu S.C., Palek J. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles // J. Cell Biol. – 1977. – Vol. 73, №3. – P. 548–560.
54. Lutz H. U. A cyclic AMP-dependent phosphorylation of spectrin dimer // FEBS Lett. – 1984. – Vol. 169, №2. – P. 323–329.
55. Manno S., Takakuwa Y., Nagao K. et al. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta–spectrine phosphorylation and dephosphorylation // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, №10. – P. 5659–5665.
56. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, №4. – P. 1943–1948.
57. Marchesi V. T. The red cell membrane skeleton: recent progress // Blood. – 1983. – Vol. 61, №1. – P. 1–11.
58. Pedroni S., Lecomte M. C., Gautero H. et al. Heterogeneous phosphorylation of erythrocyte spectrin in intact cells // Biochem. J. – 1993. – Vol. 294, №3. – P. 841–846.
59. Pinto da Silva P. Translational mobility of the membrane intercalated particles of human erythrocyte ghosts. pH-dependent, reversible aggregation // J. Cell Biol. – 1972. – Vol. 53, №3. – P. 777–787.
60. Repin N.V., Bobrova E.N., Repina S.V. Temperature-induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia // Bioelectrochemistry. – 2008. – Vol. 73, №2. – P.101–105.
61. Richter S., Hamann J., Kummerow D., Bernhardt I. The monovalent cation «leak» transport in human erythrocytes: an electroneutral exchange process // Biophys. J. – 1997. – Vol. 73, №2. – P. 737–745.
62. Rudenko S. V. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1798, №9. – P. 1767–1778.
63. Seigneuret M., Devaux Ph. F. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1984. – Vol. 81, №12. – P. 3751–3755.
64. Sheetz M. P., Singer S. J. On mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of spectrin complex // J. Cell Biol. – 1977. – Vol. 73, №3. – P. 638–646.
65. Sheetz M. P. Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins and shape // Semin. Hematol. – 1983. – Vol. 20, №3. – P.175–188.
66. Svetina S., Bozic B., Derganc J., Zeks B. Mechanical and functional aspects of membrane skeletons // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2001. – Vol. 6, №3. – P 677–690.
67. Tachev K. D., Donov K. D., Kralchevsky P. A. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2004. – Vol. 34, №2. – P. 123–140.
68. Tomishige M., Sako Y., Kusumi A. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton // J. Cell Biol. – 1998. – Vol. 142, №4. – P. 989–1000.
69. Valeri C. R., Pivacek L. E., Cassidy G. P. et al. The survival, function, and hemolysis of human RBCs stored at 4°C in additive solution (AS-1, AS-3, or AS-5) for 42 days and then biochemically modified, frozen, thawed, washed, and stored at 4°C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours // Transfusion. – 2000. – Vol. 40, №11. – P. 1341–1345.
70. Van Dort H.M., Knowles D.W., Chasis J. A. et al. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, №50. – P. 46968–46974.
71. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // J. Theor. Biol. – 1999. – Vol. 196, №3. – P. 343–361.
72. Wong P. A hypothesis on the role of the electrical charge of haemoglobin in regulating the erythrocytes shape // Med. Hypotheses. – 2004. – Vol. 62, №1. – P. 124–129.
73. Wong P. A hypothesis on the disc–sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observation // J. Theor. Biol. – 2005. – Vol. 223, №1. – P. 127–135.

Влияние хлорпромазина на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов и на структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран

Н.М. Шпакова*, Н.В. Орлова, С.С. Ершов, В.А. Бондаренко

Отдел криофизиологии клетки
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: starling_nataly@mail.ru*

Исследование механизмов повреждения и защиты биологических объектов при охлаждении и замораживании – актуальная проблема криобиологии. Получено значительное количество экспериментальных данных по этому вопросу [2, 22], однако многие механизмы криоповреждения недостаточно изучены. Это касается, прежде всего, механизмов устойчивости клеток к охлаждению и повышенной осмолярности среды, которые являются основными физико-химическими факторами повреждения при криоконсервировании.

При действии низких температур структура и функции клеток существенно изменяются. Повреждение клеток при замораживании возникает вследствие процессов кристаллизации и рекристаллизации, резкого изменения температуры, осмотического давления и pH среды. При замораживании происходят вымораживание свободной воды и концентрирование растворов в каналах между кристаллами льда.

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 207–228.
© Н.М. Шпакова, Н.В. Орлова, С.С. Ершов, В.А. Бондаренко, 2012

Используемые сокращения
$АГ_{макс}$ – максимальная антигемолитическая активность
16-ДС – 16-доксилстериловая кислота
$САГ_{макс}$ – эффективная концентрация
ТЕМПОН – 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил
ХПР – хлорпромазин

Для определения вклада каждого из факторов в общее криоповреждение клеток используют модельные эксперименты. С помощью гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов изучают повреждающее действие осмотического и температурного факторов, а также разрабатывают подходы, позволяющие предотвратить повреждение эритроцитов. Гипертонический шок представляет собой гемолиз эритроцитов в высококонцентрированных растворах хлорида натрия при положительных температурах. Гипертонический криогемолиз – гемолитическое повреждение эритроцитов в гипертонической среде при охлаждении от 37 до 0°С.

Изучению реакции эритроцитов человека на изменение осмотических и температурных условий среды посвящены многочисленные работы [9, 22], тогда как для эритроцитов животных такие данные единичны и разрознены [14, 28].

Цель представленной работы – изучение осмотической и температурной чувствительности эритроцитов млекопитающих, возможность ее коррекции с помощью хлорпромазина, оценка структурно-динамического состояния эритроцитарной мембраны в присутствии хлорпромазина.

Для исследования гипертонической чувствительности эритроцитов разных видов млекопитающих клетки переносили в среды, содержащие NaCl в концентрации от 1,0 до 4,0 моль/л, при температуре 37°С. В достаточно широком диапазоне концентраций NaCl клетки не повреждаются, и лишь при превышении некоторой концентрации электролита, называемой пороговой (концентрация соли, после которой уровень гемолиза клеток превышает 10 %), наблюдается их гемолиз. Пороговые концентрации NaCl для эритроцитов быка, лошади, собаки, человека и кролика составляют 2,25; 2,50; 2,75; 2,75 и 3,25 моль/л соответственно (рис. 1).

Кроме того, повышение уровня гемолиза эритроцитов при превышении пороговой концентрации NaCl обусловлено видом млекопитающих. По увеличению уровня гемолиза эритроцитов в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, клетки можно расположить в следующем ряду: кролик < лошадь < собака < бык < человек. Таким образом, клетки человека характеризуются самой высокой гипертонической чувствительностью, в то время как эритроциты лошади и кролика достаточно устойчивы к гипертоническому воздействию.

Разная гипертоническая чувствительность эритроцитов млекопитающих может быть связана с клеточными размерами и с величинами поверхностно-объемного отношения (S/V). В работе D.C. Betticher и соавт. [14] показано, что маленькие эритроциты характеризуются высокими значениями поверхностно-объемного отношения, и они более устойчивы к действию гипертонических сред.

Установлено, что самые крупные эритроциты человека имеют наименьшее значение *S*/*V* (1,50) и наибольший уровень гемолиза в растворе NaCl 4,0 моль/л, а клетки животных (с большим значением *S*/*V*) – более низкий уровень повреждения. Однако у эритро-

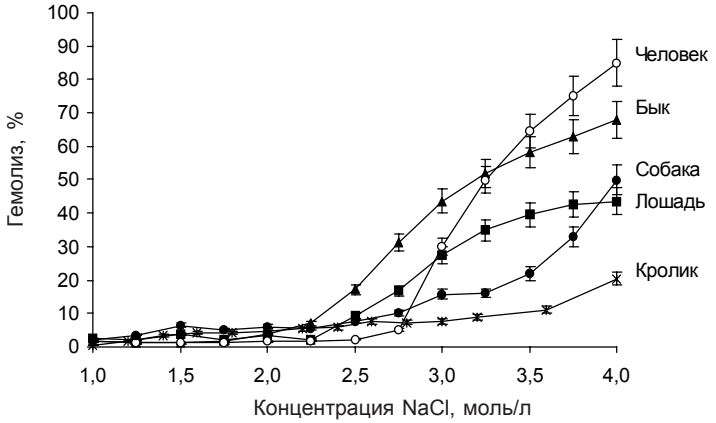


Рис. 1. Зависимости уровня гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl в среде при температуре 37°C.

цитов животных зависимость, полученная нами ранее [14], нарушается. Эритроциты быка и кролика имеют практически равные значения S/V (1,90 и 1,87), но значительно отличаются как пороговыми концентрациями (разница составляет 1,0 моль/л), так и значениями гемолиза в растворе NaCl 4,0 моль/л (в 3 раза). Экспериментально установлено, что для эритроцитов лошади при наибольшем значении S/V (1,95) характерен средний уровень гемолиза в растворе NaCl 4,0 моль/л. Вероятно, «нарушения» упомянутой закономерности [14] обусловлены особенностями состава цитоплазмы и плазматических мембран эритроцитов животных.

При перенесении в гиперосмотические условия клетка «отвечает» оттоком воды, поэтому представляет интерес проанализировать различия величин водной проницаемости мембран эритроцитов разных видов млекопитающих. Согласно литературным данным [11, 13] коэффициент диффузионной водной проницаемости (P_d) эритроцитов кролика, собаки, человека, лошади и быка составляет 10,7; 10,5; 7,58; 5,6 и 5×10^{-3} см/с соответственно. Показана значимая связь ($r_s = 0{,}978$ при $p < 0{,}05$) между величинами диффузионной водной проницаемости мембран эритроцитов млекопитающих и пороговой концентрации NaCl (при гипертоническом шоке этих клеток) методом ранговой корреляции Спирмена.

Анализ силы связи между величинами пороговой концентрации NaCl и осмотической водной проницаемости эритроцитов кролика, собаки, человека, быка и лошади (0,053; 0,027; 0,020; 0,016 и 0,012 см/с соответственно) [27] выявил сильную корреляцию ($r_s = 0{,}872$).

Эти данные свидетельствуют о значении водного транспорта в развитии гипертонической чувствительности клеток. Эритроциты кролика характеризуются наиболее высоким уровнем водного транспорта, что связывают с большим количеством водных каналов в их мембранах [23]. Кроме того, электрофореграмма мембранных белков эритроцитов кролика демонстрирует высокое содержание белков полос 4.5 и 7 [12], которые идентифицируются с водными транспортерами – гликозилированной и негликозилированной формами аквапорина 1 [23].

Вероятно, именно особенностями водного транспорта эритроцитов кролика обусловлена гипертоническая устойчивость клеток:

низкий уровень гемолиза в растворе NaCl 4,0 моль/л и высокое значение пороговой концентрации соли по сравнению с клетками других видов млекопитающих. Устойчивость эритроцитов кролика к гипертоническому стрессу, возможно, связана с высокой проницаемостью их мембран для воды [11], что обеспечивает быстрый отток воды из эритроцитов при их перенесении в гипертоническую среду и позволяет уменьшить осмотическую нагрузку на клетку и, как следствие, повреждающее действие гипертонического раствора.

Эритроциты человека при охлаждении до околонулевых температур повреждаются после их предварительной инкубации в гипертонической среде до начала охлаждения. Это явление часто называют «холодовым шоком» или «гипертоническим криогемолизом» эритроцитов. Термин «гипертонический криогемолиз» подчёркивает отличительную особенность явления гемолиза эритроцитов при охлаждении до околонулевых температур, т. е. необходимость предварительной экспозиции эритроцитов в гипертонических растворах.

Для гипертонического криогемолиза эритроцитов необходимы два этапа: инкубация эритроцитов в гипертонической среде при температуре 37°C и охлаждение до 0°C в среде той же тоничности.

Концентрационные зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих (рис. 2) имеют выраженный максимум (за исключением клеток быка и кролика): эритроциты человека и собаки – в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl, а лошади – 1,4–1,6 моль/л NaCl. Для клеток быка и в большей степени кролика характерно относительно равномерное увеличение уровня гипертонического криогемолиза во всем диапазоне концентраций NaCl.

Выявленная разная реакция эритроцитов млекопитающих на воздействие одинаковых условий среды, по-видимому, связана с видовыми различиями состава и свойств эритроцитов млекопитающих [29].

Эритроциты кролика и быка, которые достаточно устойчивы к гипертоническому криогемолизу, отличаются от клеток других млекопитающих высоким содержанием холестерина [29]. Этот липид увеличивает степень упорядоченности и снижает подвиж-

ность углеводородных цепей мембранных фосфолипидов в жидкокристаллическом состоянии [24], что приводит к усилению плотности и снижению проницаемости мембран, увеличению их микровязкости [25].

Кроме того, эритроцитарные мембраны млекопитающих различаются по содержанию тех фосфолипидов, которые определяют текучесть мембраны, в частности сфингомиелин и фосфатидилэтаноламин приводят к снижению, а фосфатидилхолин – к повышению этого показателя [30]. Эритроциты, характеризующиеся высоким содержанием сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина и низким фосфатидилхолина, более устойчивы к повреждающему действию гипертонического криогемолиза – это клетки быка и кролика.

Анализ полученных результатов и данных литературы [30] позволяет говорить о том, что именно текучесть как суммарный показатель состояния мембраны определяет чувствительность клеток к действию гипертонического криогемолиза. Сенсибилизирующее влияние гипертонических растворов на эритроциты к последующему охлаждению связывают с латеральным разделением

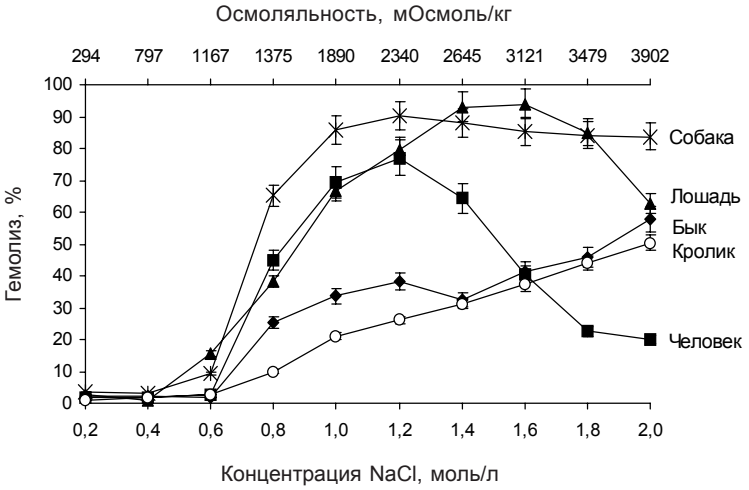


Рис. 2. Влияние разных концентраций NaCl на уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих при их охлаждении от 37 до 0°С.

липидов [3]. По-видимому, клетки, в мембранах которых затруднено латеральное движение компонентов, проявляют высокую устойчивость к охлаждению в гипертонических условиях.

Эритроциты млекопитающих по содержанию внутриклеточного калия делят на две большие группы: с высоким и низким содержанием ионов K^+. К первой группе относятся эритроциты человека, лошади и кролика, ко второй – быка и собаки [15]. Однако полученные нами данные о разной осмотической и температурной чувствительности эритроцитов, в частности быка и собаки, свидетельствуют в пользу того, что чувствительность этих клеток к стрессовым факторам не зависит от внутриклеточного содержания ионов K^+.

Многие амфифильные соединения двояко влияют на клетки: в высоких концентрациях – индуцируют лизис, в низких – оказывают защитный эффект при действии неблагоприятных факторов среды [10, 19]. Так, в работе H. Hagerstrand и соавт. [19] показано, что гипотоническое повреждение эритроцитов человека можно предотвратить введением в среду различных амфифильных веществ, в том числе и хлорпромазина (ХПР).

Использование ХПР позволяет существенно снизить уровни гипертонического гемолиза и криогемолиза эритроцитов не только человека [10], но и собаки, лошади, быка и кролика (табл. 1). Для сравнения протектирующего действия ХПР при гипертоническом шоке и гипертоническом криогемолизе эритроциты разных видов млекопитающих использовали понятия «антигемолитическая активность» и «эффективные концентрации вещества».

Антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как процент снижения гемолиза клеток в присутствии исследуемого вещества по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил. Размеры плато – это диапазон концентраций амфифильного вещества, в пределах которых наблюдается минимальный лизис клеток. За эффективную концентрацию амфифильного соединения принимали концентрацию, соответствующую середине плато. В этой концентрации амфифил оказывает максимальное антигемолитическое действие.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что при 37°С ХПР проявляет высокую антигемолитическую активность в условиях

Таблица 1. Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{макс}$), эффективных концентраций ($САГ_{макс}$) и размеров плато ХПР при гипертоническом стрессе эритроцитов человека при 37°С в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl

Эритроциты млекопитающих	$АГ_{макс}$, %	$САГ_{макс}$, мкмоль/л	Размер плато, мкмоль/л
Человек	77 ± 2*	124 ± 8	60 ± 5÷140 ± 6
Собака	80 ± 9*	110 ± 5	35 ± 15÷180 ± 28
Лошадь	86 ± 8*	90 ± 5	43 ± 13÷133 ± 29
Бык	76 ± 7*	70 ± 5	70 ± 10÷143 ± 6
Кролик	19 ± 9*	70 ± 5	48 ± 8÷95 ± 10

Примечание: * – значения статистически не отличаются при $P_U < 0,05$.

гипертонического шока эритроцитов всех исследованных млекопитающих (около 80%), за исключением клеток кролика (19%). Важен тот факт, что, несмотря на различный уровень исходного гипертонического повреждения эритроцитов (рис. 1), а также разные значения эффективных концентраций ХПР, уровни максимальной антигемолитической активности вещества для эритроцитов всех исследуемых млекопитающих примерно одинаковы, за исключением клеток кролика.

В условиях гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, лошади, быка и кролика антигемолитическая активность ХПР составляет ~70%, собаки – ~45% (табл. 2).

Следует отметить, что для эритроцитов человека характерны одинаковые значения эффективных концентраций и одинаковые величины антигемолитической активности ХПР при обоих видах стресса – гипертоническом шоке и гипертоническом гемолизе. Для эритроцитов исследованных животных такой особенности не выявлено (табл.1 и 2).

В основе гипертонического лизиса и гипертонического криогемолиза эритроцитов лежат процессы, связанные с формированием

трансмембранных дефектов, которые развиваются до размера гемолитических пор [1]. ХПР может изменять структурное состояние как липидных, так и белковых компонентов мембраны и модифицировать белок-липидные взаимодействия [6, 17]. Протектирующее действие ХПР, по-видимому, имеет комплексный характер и осуществляется через влияние на ассоциацию белков цитоскелета с мембраной и через действие молекул ХПР на процессы, сопровождающие увеличение дефектов бислоя.

В основе механизма защитного эффекта амфифильных веществ, по-видимому, лежит способность их молекул встраиваться в мембрану и инициировать процессы, которые препятствуют формированию мембранных макроскопических пор. Наиболее вероятно, что антигемолитическое действие амфифилов, в частности ХПР, связано с временным «разупорядочиванием» эритроцитарной мембраны [19].

Эффект ХПР на биологические мембраны зависит от концентрации амфифила. Вместе с тем имеются лишь единичные данные о характере изменений динамической структуры и функции мембран при действии ХПР в широком концентрационном

Таблица 2. Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{макс}$), эффективных концентраций ($САГ_{макс}$) и размеров плато ХПР при гипертоническом криогемолизе эритроцитов человека в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl

Эритроциты млекопитающих	$АГ_{макс}$, %	$САГ_{макс}$, мкмоль/л	Размер плато, мкмоль/л
Человек	70 ± 3*	120 ± 20	100 ± 6÷140 ± 10
Собака	44 ± 9*	82 ± 21	53 ± 22÷110 ± 20
Лошадь	76 ± 2*	240 ± 7	173 ± 18÷308 ± 9
Бык	70 ± 4*	155 ± 5	20 ± 0÷290 ± 10
Кролик	70 ± 3*	145 ± 10	50 ± 10÷240 ± 20

Примечание: * – значения статистически не отличаются при $P_U < 0,05$.

интервале. Можно предположить, что бимодальное влияние ХПР на клетки (способность вещества защищать клетки в условиях стресса или оказывать литический эффект в зависимости от концентрации ХПР) вызвано изменением характера модификации мембраны при увеличении концентрации вещества.

Структурно-динамическое состояние мембраны эритроцитов, обработанных ХПР, исследовали методом ЭПР-спектроскопии с использованием спин-меченого зонда 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС), локализация нитроксильного радикала которого позволяет оценить состояние гидрофобной зоны эритроцитарной мембраны. Для определения локализации 16-ДС в мембране использовали уширяющий агент феррицианид калия (0,1 моль/л), который не проникает в нативные эритроциты [8, 30] Частоту вращательной подвижности зонда 16-ДС (параметр микровязкости), а также параметр анизотропии спектров вычисляли, как описано ранее [13]. В качестве эмпирического параметра упорядоченности использовали разность значений максимального и минимального расщепления спектра ЭПР липидного зонда [14].

В суспензии эритроцитов подавляющее большинство молекул 16-ДС встраивается в мембраны. Суперпозиция спектра ЭПР в высоком поле отражает частичную растворимость спин-меченой жирной кислоты в воде. Сигнал от зонда в полярной среде (характеризуемый более высоким значением константы изотропного взаимодействия) уширяется при добавлении ионов феррицианида, что свидетельствует о локализации части молекул зонда во внеклеточной воде, по-видимому, в виде мицелл. При распределении спиновых зондов между водой и мембраной для оценки «гидрофобной емкости» мембраны используют параметр, пропорциональный отношению интенсивностей «гидрофобного» и «полярного» сигналов [13]. Интенсивность «полярного» сигнала должна зависеть как от объема внеклеточной среды, так и физико-химических свойств гидрофобной зоны мембраны, определяющих сорбирующую емкость мембраны в отношении зонда [13]. При использовании одинаковых концентраций эритроцитов во всех экспериментах эмпирический параметр встраивания (диффузии) зонда в мембрану, пропорциональный интенсивности «гидрофобного» сигнала ЭПР, отражает состояние липидных областей, сорбирующих молекулы зонда.

Анализ ЭПР-спектров липидного зонда в биомембранах требует учета параметров, отражающих частоту и амплитуду движения нитроксильного фрагмента зонда. Параметр анизотропии спектров ЭПР спин-меченых жирных кислот, пропорциональный отношению частот вращения радикала, рассчитанных по разным компонентам спектра (ν^- и ν^+), связан с несферичностью вращения радикала и отражает различие частот вращательной подвижности зонда вокруг оси симметрии молекулы и перпендикулярных к ней направлений [11]. Вследствие параллельной ориентации главной оси нитроксильного фрагмента доксильных жирных кислот относительно оси симметрии молекулы, совпадающей с осью симметрии молекул фосфолипидов в бислое, параметр упорядоченности вращения характеризует анизотропию вращения радикала и, в определенной мере, отражает упорядоченность липидного микроокружения зонда [12]. Увеличение частоты вращения вокруг направлений, перпендикулярных оси симметрии фосфолипидов, или увеличение амплитуды движения (например, вследствие относительного увеличения гибкости сегментов жирно-кислотных цепей) могут приводить к качественно подобным изменениям вида спектра ЭПР спин-меченых жирных кислот [12].

Характеристики вращательной подвижности нитроксильного фрагмента липидного зонда 16-ДС (частоты вращательной подвижности и параметр анизотропии спектра зонда) в мембранах эритроцитов, обработанных ХПР, представлены на рис. 3 и 4. При небольших концентрациях ХПР (до 200 мкмоль/л) выявлены немонотонные зависимости частоты вращательной подвижности зонда, рассчитанной по низкополь-

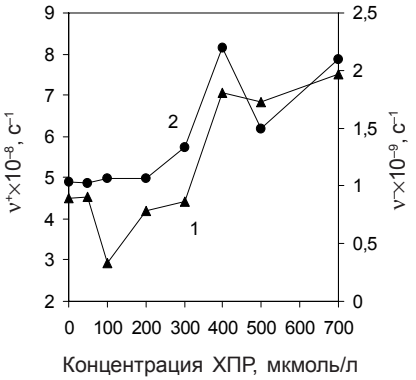


Рис. 3. Зависимость параметров вращательной подвижности зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов от концентрации хлорпромазина в суспензии клеток (10^9 кл/мл) при температуре 37°С: 1 – ν^+; 2 – ν^-.

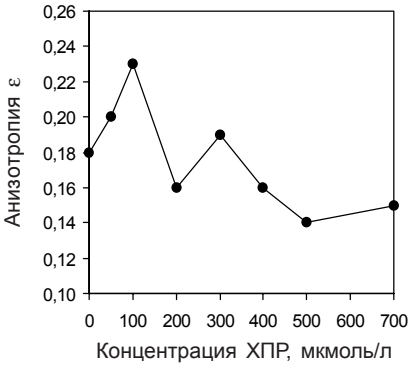


Рис. 4. Влияние различных концентраций хлорпромазина на параметр анизотропии спектра ЭПР зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) при температуре 37°С.

ной компоненте спектра (ν^+) (рис. 3), и параметра анизотропии спектра (ε) (рис. 4).

Высокопольный параметр вращения ν^- практически не изменялся при небольших концентрациях амфифила (см. рис. 3). В присутствии 100 мкмоль/л ХПР уменьшение частоты вращательной подвижности (ν^+) зонда сопровождалось увеличением параметра анизотропии (рис.3 и 4). Скачкообразное изменение параметра анизотропии спектра 16-ДС отмечено в интервале концентраций 100–200 мкмоль/л (рис. 4), причем при концентрации ХПР 200 мкмоль/л обнаружено увеличение высокопольного параметра ν^- (см. рис. 3). Свыше этой концентрации наблюдалось резкое растормаживание вращения зонда вокруг различных осей (см. рис. 3), сопровождающееся уменьшеним параметра анизотропии спектра (рис. 4).

Анализ вида спектров зонда 16-ДС в эритроцитарной мембране в присутствии ХПР показал, что при небольших концентрациях вещества (до 200 мкмоль/л) наблюдается немонотонное изменение интенсивности «гидрофобного» сигнала в спектре ЭПР. При концентрации ХПР 300 мкмоль/л и выше в суспензии клеток отмечено резкое уменьшение интенсивности «полярного» сигнала (до исчезновения), что свидетельствует об увеличении диффузии молекул зонда в мембрану и отражает видимое увеличение ее гидрофобной емкости.

Особенности изменений динамической структуры мембраны, вызываемые высокими концентрациями ХПР, были исследованы с применением зонда 16-ДС и парамагнитных ионов феррицианида,

не проникающих через мембрану. При этом мы исходили из предположения, что нарушение барьерной функции мембран по отношению к внеклеточным ионам феррицианида связано со значительным нарушением упаковки липидов, которое может быть зарегистрировано по увеличению доступности липидного зонда 16-ДС для ионов феррицианида.

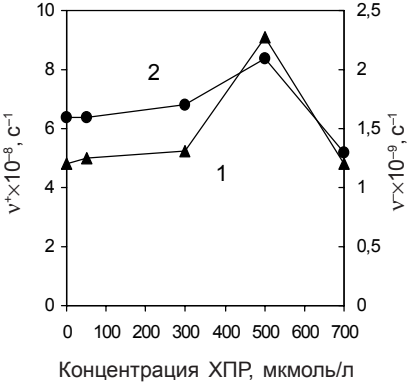


Рис. 5. Зависимость параметров вращательной подвижности зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) от концентрации хлорпромазина в присутствии ионов феррицианида калия (0,1 моль/л) при температуре 37°C : 1 – ν^+; 2 – ν^-.

Установлено, что введение феррицианида калия в суспензию клеток, обработанных ХПР, оказывает влияние на параметры вращательной подвижности зонда 16-ДС в эритроцитарных мембранах, рассчитанные по разным компонентам спектра (рис. 3 и 5). Так, в присутствии ионов феррицианида наблюдаются значительное снижение значений частот вращательной подвижности зонда в мембране при 300 мкмоль/л ХПР и разнонаправленное изменение значений параметров вращения при 500 и 700 мкмоль/л ХПР.

Данные рис. 5 и 6 показывают, что в присутствии феррицианида повышение концентрации ХПР до 300 мкмоль/л не приводит к существенному изменению частоты вращения зонда и величины параметра упорядоченности в мембране, в то время как добавление парамагнитных ионов в суспензию, содержащую 500 и 700 мкмоль/л ХПР, сопровождается различными эффектами. Последнее свидетельствует о разном характере структурных перестроек мембран эритроцитов, что определяет и разную реакцию эритроцитарных мембран на воздействие ХПР и ионов феррицианида.

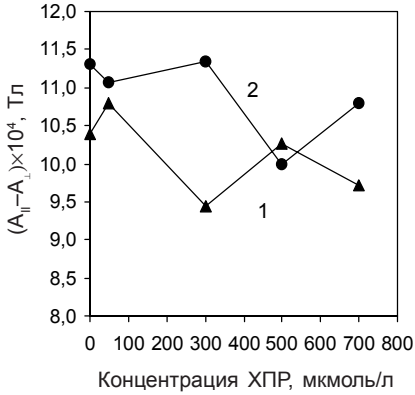


Рис. 6. Зависимость параметра упорядоченности вращения зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) от концентрации хлорпромазина при температуре 37°С: 1 – без феррицианида калия; 2 – в присутствии феррицианида калия (0,1 моль/л).

Доступность гидрофобной зоны мембран эритроцитов, модифицированных ХПР, для внеклеточных ионов феррицианида определяли по их влиянию на изменение ширины центральной компоненты спектра ЭПР липидного зонда 16-ДС (рис. 7). Дополнительное уширение компонент спектра спиновых зондов может быть обусловлено взаимодействием нитроксилов при концентрировании зонда либо увеличением доступности нитроксилов для ионов феррицианида [5]. Видно, что значения данного параметра незначительно изменяются при повышении концентрации вещества до 500 мкмоль/л, причем введение ионов феррицианида практически не изменяет вид зависимости (рис. 7). Некоторое уширение спектра при действии 500 мкмоль/л ХПР без феррицианида может быть обусловлено динамическими эффектами (см. рис. 3, 7). В присутствии 700 мкмоль/л ХПР и феррицианида калия обнаружены значительное уменьшение вращательной подвижности зонда 16-ДС (см. рис. 5) и уширение спектра (рис. 7).

Таким образом, при действии ХПР (500 мкмоль/л) и ионов феррицианида наблюдаемые резкое растормаживание вращения (см. рис. 5) и уменьшение параметра упорядоченности (см. рис. 6) при отсутствии дополнительного уширения (рис. 7) компонент спектра ЭПР зонда 16-ДС свидетельствуют о перестройке динамической структуры эритроцитарной мембраны, не приводящей, по-видимому, к увеличению взаимодействия нитроксилов или увеличению доступности нитроксилов для ионов феррицианида в гидрофобной зоне мембраны.

При максимальной концентрации ХПР (700 мкмоль/л) в присутствии ионов феррицианида отмечены значительное уменьшение подвижности (см. рис. 5) и увеличение упорядоченности вращения радикальных фрагментов 16-ДС (см. рис. 6) на фоне резкого уширения спектра (рис. 7).

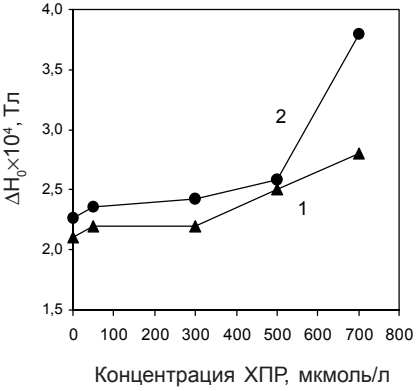


Рис. 7. Влияние хлорпромазина на ширину центральной компоненты спектра ЭПР зонда 16-ДС (5×10^{-5} моль/л) в мембране эритроцитов (10^9 кл/мл) при температуре 37°С: 1 – без феррицианида калия; 2 – в присутствии феррицианида калия (0,1 моль/л).

Сравнительный анализ изменения характеристик вращения липидного зонда в эритроцитарных мембранах, обработанных 700 мкмоль/л ХПР, в присутствии феррицианида калия и без него свидетельствует о структурной перестройке мембраны, сопровождающейся, вероятнее всего, увеличением взаимодействия нитроксильных фрагментов зонда в гидрофобной зоне мембраны.

Полученные данные дают основание полагать, что увеличение проницаемости эритроцитарных мембран при действии высоких концентраций ХПР обусловлено структурно-фазовой перестройкой динамической структуры мембран, причем ее характер изменяется в зависимости от концентрации вещества.

Известно, что катионный амфифил ХПР практически мгновенно встраивается в мембраны эритроцитов, вызывая стоматоцитоз, свидетельствующий о преимущественном распределении молекул амфифила во внутреннем монослое мембраны, содержащем кислые фосфолипиды [16]. Ограничение смешиваемости молекул амфифила с липидами при определенной концентрации вещества может приводить к увеличению гетерогенности динамической структуры, т. е. появлению областей, обогащенных молекулами амфифила [26]. Возможно, этим обусловлено наблюдаемое нами

немонотонное изменение эмпирического параметра диффузии зонда 16-ДС в мембрану при небольших концентрациях ХПР в суспензии клеток.

Учитывая размер и строение молекулы ХПР, можно заключить, что при концентрациях до 100 мкмоль/л встраивание его молекул в фосфолипидный бислой приводит, главным образом, к увеличению упорядочивающего влияния липидов на движение зонда (см. рис. 3, 4) вследствие уменьшения сегментальной гибкости и/или амплитуды движения сегментов жирнокислотных цепей фосфолипидов [34]. В интервале концентраций хлорпромазина 100–200 мкмоль/л уменьшение анизотропии спектра (см. рис. 4) и увеличение частоты вращения зонда (ν^{+}) (см. рис. 3) до значений, близких к контрольным (при отсутствии ХПР), позволяют предположить, что влияние молекул амфифила на упаковку липидов в бислое уменьшается. Это косвенно может отражать перераспределение амфифильных молекул, приводящее к появлению в мембране областей, обогащенных молекулами ХПР. Можно предположить, что при определенных концентрациях ХПР структурно-функциональная целостность эритроцитарных мембран сохраняется в результате образования в мембране смешанных мицелл или эндовезикуляции [20].

Несмотря на общепринятые представления о плазматических мембранах как бислоях с ламеллярной упаковкой липидов, некоторые структурно-функциональные характеристики биомембран могут быть объяснены существованием в бислое неизоморфных жидкокристаллических структур [19]. Возможно, что присутствие в бислое неламеллярных фаз не является уникальным свойством немногих природных мембран, а скорее, обусловлено необходимостью сохранять структурно-функциональную целостность при значительной гетерогенности компонентного состава, в том числе в присутствии модификаторов упаковки липидов (белков и стероидов), свободных жирных кислот и ионов [20,21].

Структурный полиморфизм изучен в основном на искусственных мембранах, образованных из одного или двух фосфолипидов, при действии факторов, влияющих на динамический объем молекул липидов. Так, в модельных мембранах, построенных из фосфолипидов, характерных для эритроцитарных мембран, методами

^{31}Р-ЯМР и ЭПР исследованы неизоморфные жидкокристаллические структуры и показана зависимость полиморфных переходов от температуры и модификации водно-липидных взаимодействий [23,34]. Ранее делались предположения об участии небислойных структур, в том числе изотропных фаз, в механизмах воздействия амфифильных агентов на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов (участие гексагональных фаз в трансбислойном переносе фосфолипидов и амфифилов, конкурентно-везикуляторный механизм гемолиза эритроцитов) [2, 24].

Методом ЭПР спектрометрии с помощью спин-меченого амида пальмитиновой кислоты была показана модификация динамической структуры водно-липидной поверхности эритроцитарной мембраны при действии различных концентраций ХПР, при этом выявлен экстремальный характер зависимости параметра несферичности вращения зонда в интервале концентраций 100–200 мкмоль/л ХПР [6]. Таким образом, модификация ХПР структуры эритроцитарных мембран затрагивает как водно-липидную поверхность, так и гидрофобную зону мембраны.

Наиболее существенные различия в параметрах вращательной подвижности липидного зонда 16-ДС в эритроцитарных мембранах при действии 50–200 и 300–700 мкмоль/л ХПР на клетки при отсутствии феррицианида калия заключаются в резком растормаживании вращения зонда вокруг различных осей при высоких концентрациях ХПР в суспензии эритроцитов (см. рис. 3). Не исключено, что резкое растормаживание подвижности зонда при действии 300 мкмоль/л ХПР обусловлено его включением в эндовезикулы, образование которых может быть защитной реакцией мембран [7, 20].

«Узкий» спектр зонда 16-ДС исчезает при добавлении феррицианида калия к суспензии клеток, причем параметры вращения зонда практически не изменяются. Это свидетельствует о доступности радикальных фрагментов зонда 16-ДС (пренебрежимо малого количества, практически не влияющего на суммарный спектр мембранного зонда) для ионов феррицианида во внеклеточной среде в суспензии клеток. Учитывая, что параметр ширины спектра 16-ДС содержит как динамическую, так и концентрационную составляющие [5], количество зонда в образце (коли-

чество радикальных центров [5]) можно оценивать по спектрам ЭПР, по-видимому, только в интервале концентраций ХПР до 300 мкмоль/л. Для этих концентраций характерно незначительное и монотонное влияние феррицианида на параметр ширины спектров. Отсутствие суперпозиции сигналов ЭПР, обусловленной различной полярностью микроокружения радикального фрагмента 16-ДС, свидетельствует о гидрофобном микроокружении радикалов при действии ХПР в концентрации 300 мкмоль/л. Это свидетельствует о внутримембранной локализации молекул 16-ДС, и, возможно, частичной эндовезикуляции. Добавление феррицианида калия в суспензию клеток приводило к резкому затормаживанию вращения липидного зонда. Уменьшение интенсивности сигнала ЭПР в этом случае было сравнимо с уменьшением компонент спектра, наблюдаемым при добавлении феррицианида в суспензию эритроцитов, не содержащую ХПР. Следовательно, приведенное объяснение не исключает влияния ионов феррицианида на характер вызываемых ХПР изменений структуры мембран, что приводит к доступности части радикальных фрагментов зонда 16-ДС для уширителя. Таким образом, структура неламеллярной фазы может зависеть как от концентрации ХПР, так и от дополнительного действия феррицианид-анионов.

Поскольку добавление феррицианида калия не сопровождается существенным увеличением числа клеток с поврежденной мембраной, затормаживание вращения зонда, вероятнее всего, не обусловлено проникновением ионов феррицианида в клетки. Это позволяет говорить о том, что параметры динамической структуры эритроцитарных мембран при действии 300 мкмоль/л ХПР и феррицианида характеризуют в основном неповрежденные мембраны.

Результаты исследования доступности молекул зонда для ионов феррицианида при более высоких концентрациях хлорпромазина дают основание полагать, что увеличение повреждения мембран связано с влиянием феррицианида на характер упаковки липидов. Например, показано влияние ионов феррицианида (0,3 моль/л) на гидрофобную зону и температурно-зависимые перестройки модельных мембран [4]. Несмотря на то, что мы применяли феррицианид калия в более низкой концентрации, результаты свидетельствуют о возможном действии ионов феррицианида как

одного из дополнительных факторов, влияющих на динамику мембран.

С использованием водорастворимого зонда ТЕМПОН и феррицианида калия было показано [8], что ХПР в концентрациях до 200 мкмоль/л не нарушает барьерные свойства эритроцитарных мембран, при высоких концентрациях (> 200 мкМ) наблюдается возрастающее повреждение барьерных свойств мембраны по отношению к ионам феррицианида.

Основываясь на вышеприведенных результатах [8] и анализа изменений спектра ЭПР мембранного зонда 16-ДС, индуцированных высокими концентрациями ХПР в присутствии ионов феррицианида, можно сделать следующие предположения относительно структуры дефектов упаковки липидов в мембране эритроцитов. Резкое увеличение частот вращательной подвижности и уменьшение упорядоченности вращения липидного зонда 16-ДС при действии ХПР в концентрации 500 мкмоль/л и ионов феррицианида, сопровождаемое увеличением проникновения внеклеточных ионов во все клетки, обусловлены, очевидно, генерализованным изменением упаковки липидов. При действии ХПР (500 мкмоль/л) спин-меченые группы зонда 16-ДС находятся, по-видимому, в гидрофобном микроокружении липидных хвостов эритроцитарных мембран и недоступны ионам феррицианида. Эта модель согласуется с предположением о появлении в мембране гексагональной фазы и гидрофильных каналов небольшого размера [18, 21], образованных полярными головками молекул липидов и зонда, вследствие чего слабо увеличивается доступность зонда ТЕМПОН для ионов феррицианида [8].

Обращение значений параметров микроокружения зонда 16-ДС в мембранах при концентрации ХПР 700 мкмоль/л, наблюдаемое при дополнительном воздействии ионов феррицианида, и увеличение (по сравнению с концентрацией ХПР 500 мкмоль/л) доступности внутриклеточного зонда ТЕМПОН для ионов феррицианида [8] свидетельствуют в пользу изменения структуры дефектов. Значительное уширение спектра и уменьшение вращательной подвижности зонда 16-ДС позволяют заключить, что определенную роль в увеличении проницаемости мембран для ионов феррицианида могут играть дефекты упаковки липидов, представляющие

большие по диаметру водные каналы, поверхность которых образована полярными головками липидов и молекул зонда. При этом радикальные фрагменты 16-ДС сближены и находятся в более плотном микроокружении гидрофобных хвостов фосфолипидов.

Очевидно, что полученные данные не позволяют сделать более определенные выводы о природе фазово-структурных перестроек мембран эритроцитов при действии ХПР. Следует отметить, что значения антигемолитических концентраций ХПР, полученные при изучении гипертонического шока и гипертонического криогемолиза эритроцитов человека [10], попадают в диапазон низких концентраций амфифила (до 200 мкмоль/л). Это позволяет рассматривать выявленные нами перестройки динамической структуры мембраны при действии низких концентраций амфифила как адаптивные, важная роль в которых может принадлежать изменению степени полиморфизма мембраны [7]. Можно полагать, что дальнейшие исследования влияния физико-химических факторов на динамическую структуру мембран с привлечением методов, регистрирующих полиморфные переходы, позволят получить однозначные данные о возможной роли небислойных фаз в неспецифическом изменении структурно-функционального состояния плазматических мембран.

Литература

1. 1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А. и др. Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – №2. – С. 25–32.
2. Белоус А.М.. Грищенко В.И. Криобиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 432 с.
3. Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е. Основные закономерности явления гипертонического криогемолиза // Проблемы криобиологии. – 1997. – №3. – С. 3–7.
4. Гребенщиков Ю.Б., Тимофеев К.Н., Лихтенштейн Г.И., Мошковский Ю.Ш. Изучение влияния KCl и $K_3Fe(CH)_6$ на структуру липосомальных мембран, модифицированных спиновыми зондами при 5–50°С // Биофизика. – 1983. – Т. 28, №4. – С. 637–643.
5. Дегтярев А.В. Механохимическая модель холодового шока эритроцитов // Криоповреждение и криозащита биологических объектов. – К.: Наук. думка, 1988. – С. 3–6.
6. Кузнецов А.И. Метод спинового зонда (основы и применение). – М.: Наука, 1976. – С. 95–103.
7. Кузурман П.А., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б. О механизме полиморфных превращений в фосфатидилхолиновых мембранах // Биофизика. – 2002. – Т. 47, №5. – С. 842–847.
8. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
9. Метод спиновых меток. Теория и применение / Под ред. Л. Берлинера. – М.: Мир, 1979. – С. 489–569.

10. Орлова Н.В., Цымбал Л.В., Шпакова Н.М. Действие хлорпромазина на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов // Биол. вестник ХГУ. – 1999. – Т. 3, №1–2. – С. 71–75.
11. Розин В.В., Сенькович О.А., Черницкий Е.А. Влияние температуры на гемолиз и везикуляцию эритроцитов, индуцированных додецилсульфатом натрия // Биол. мембраны. – 2001. – Т. 18, №4. – С. 294–298.
12. Сорокоумова Г.М., Селищева А.А., Тюрин О.П. и др. Влияние водорастворимых немембранных белков на структурную организацию фосфолипидов // Биофизика. – 2002. – Т. 47, №2. – С. 268–277.
13. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно–функционального состояния мембран эритроцитов // Биол. мембраны. – 2005. – Т. 22, №4. – С. 327 – 335.
14. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. – 1995.– Т. 60, №10. – С. 1624 – 1631.
15. Benga G., Borza T. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells//Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. – 1995. – 112, №4. – P. 653 – 659.
16. Benga G., Holmes R.P. Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1984. – Vol. 43, №3. – P. 195–257.
17. Benga G., Matei H., Borza T. et al. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. V. Rabbit (Oryctolagus cuniculus) // Comp. Biochem. Physiol. – 1993. – Vol. 106B, №2. – P. 281–285.
18. Benga G., Matei H., Frentescu L. et al. Comparative nuclear magnetic resonance studies of diffusional water permeability of red blood cells from different species. XI. Horses introduced to Australia and European horses (Equus caballus) // Comp. Haematol. Int. – 2000. – Vol. 10, №3. – P. 138–143.
19. Betticher D.C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A. – 1989. – Vol. 93A, №2. – P. 429–432.
20. Bogner P., Sipos K., Ludany A. et al. Steady-state volumes and metabolism–independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J. – 2002. – Vol. 31, №2. – P. 145–152.
21. Chen J.Y., Brunauer L.S., Chu F.C. et al. Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol. 1616, №1. – P. 95–105.
22. Cullis P.R., Hope M.J., Tilcock C.P. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes // Chem. Phys. Lipids. – 1986. – Vol. 40, №2–4. – P. 127–144.
23. Epand R.M. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol. 1376, №3. – P. 353–368.
24. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem. Biol. Interact. – 1991. – Vol. 79, №3. – P. 335–347.
25. Hagerstrand H., Isomaa B. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – Vol. 1109, №2. –P. 117–126.
26. Hardman P.D. Spin–label characterisation of the lamellar-to-hexagonal (HII) phase transition in egg phosphatidylethanolamine aqueous dispersions // Eur. J. Biochem. – 1982. – Vol. 124, №1. – P. 95–101.
27. Kursch B., Lulimann H., Mohr K. Influence of various cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phosphatidylcholine liposomes // Biochem. Pharmacology. – 1983. – Vol. 32, №17. – P. 2589 – 2594.
28. Life in the frozen state / Edited by B.J.Fuller, N. Lane, E.E.Benson.– Boca Raton: CRC Press, 2004.– 672 p.
29. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J. Cell. Mol. Med. – 2000. – Vol. 4, №4. – P. 270–276.

30. Morse P.D. Use of the spin label tempamine for measuring the internal viscosity of red blood cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1977.– Vol. 77, №4. – P. 1486–1491.
31. Ohvo–Rekila H., Ramstedt B., Leppimaki P., Slotte J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes // Prog. Lipid Res. – 2002. – Vol. 41, №1. – P. 66–97.
32. Simons K., Waz W.L.C. Model systems, lipid raft, and cell membrans // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure. – 2004. – Vol. 33. – P. 269–295.
33. Schreier S., Malheiros S.V.P., Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1508, №1. – P. 210–234.
34. Song C., Holmsen H., Nerdal W. Existence of lipid microdomains in bilayer of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and 1-stearoyl-2-docosahexenoyl phosphatidylserine (SDPS) and their perturbation by chlorpromazine: A ^{13}C and ^{31}P solid-state NMR study // Biophys. Chem. – 2006. – Vol. 120, №3. – P. 178–187.
35. Tsai S.T., Zhang R.B., Verkman A.S. High channel-mediated water permeability in rabbit erythrocytes: characterization in native cells and expression in xenopus oocytes // Biochemistry. – 1991. – Vol. 30, №8. – P. 2087–2092.
36. Watson P.F., Morris G.J. Cold shock injury in animal cells // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1987. – Vol. 41. – P. 311–340.
37. Wessels J.M., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – Vol. 291, №1 – P. 190–196.
38. Yawata Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2003. – 448 p.

Структурно-функциональные изменения стволовых гемопоэтических клеток кордовой крови под действием криопротекторов и низких температур

Л.А. Бабийчук, В.В. Рязанцев, П.М. Зубов, О.Л. Зубова

Отдел криоцитологии и количественной морфологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
электронная почта: ucblood@mail.ru

В последнее время кордовая кровь и полученные из нее препараты находят все большее применение в клинической практике как альтернативный костному мозгу источник стволовых гемопоэтических клеток.

Длительное время трансплантация костного мозга (КМ) являлась основным методом лечения многих патологических состояний иммуногемопоэтической системы различного генеза. Однако трудности, обусловленные сложностью и длительностью подбора HLA-идентичных доноров КМ, необходимостью их госпитализации и риском, связанным с забором КМ, а также повышенной опасностью возникновения осложнений у реципиентов в результате относительно высокого уровня инфицированности трансплантата и осложнениями посттрансплантационного периода вследствие развития иммунных конфликтов в системе донор-реципиент при пересадке, определили поиск альтернативных КМ источников гемопоэтических клеток [11].

Особое внимание было уделено исследованию клеток эмбриональной печени (КЭП), обладающих значительно меньшей иммунологической реактивностью, и, следовательно, имеющих преи-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 229–270.
© Л.А. Бабийчук, В.В. Рязанцев, П.М. Зубов, О.Л. Зубова, 2012

мущество по сравнению с аллогенным КМ [7]. Вместе с тем проблемы этического и юридического характера, связанные с получением этого материала, обусловили поиск новых источников кроветворной ткани.

Исследования S. Knudtzon [28] и H.E. Broxmeyer [20] впервые показали наличие в кордовой крови (КК) большого числа примитивных и коммитированных предшественников гемопоэза, а также выявили способность стволовых клеток, выделенных из КК, репопулировать костный мозг и восстанавливать гемопоэз после проведения трансплантации.

Используемые сокращения
2,3 ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат
7AAD – 7-аминоактиномицин D
АФП – альфа-фетопротеин
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
ДК – донорская кровь
ДМСО – диметилсульфоксид
КК – кордовая кровь
КМ – костный мозг
КОЕ-ГМ – гранулоцитарно-макрофагальная колониеобразующая единица
КЦКК – криоконсервированная цельная кордовая кровь
ПЭО-1500 – полиэтиленоксид с м.м. 1500
ФС – фосфатидилсерин
ЯСК – ядросодержащие клетки
FITC – флуоресцеин изотиацианат (fluorescein isotiacyanate)
PE – фикоэритрин (phycoerythrin)

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) кордовой крови характеризуются мультипотентностью и дают начало клеточным линиям, конечные элементы которых образуют форменные элементы крови, а также ряд специализированных тканевых клеток иммунной системы. Стволовые кроветворные клетки морфологически подобны лимфоцитам и представляют собой относительно однородную совокупность клеток с почти круглыми ядрами, мелкодисперсным хроматином и небольшим количеством слабобазофильной цитоплазмы.

Кордовой (плацентарной, пуповинной, фетальной) называется кровь, которая остается в сосудах плаценты и пуповины после рождения ребенка и отделения его от матери. Относительная простота получения стволовых клеток из КК и отсутствие явных этических противоречий способствовали применению этих клеток в практической медицине.

В 1988 году была проведена первая успешная трансплантация кордовой крови ребенку с анемией Фанкони. После публикации

этого клинического случая появились первые банки КК в США и Европе. Сейчас в мире насчитывается более 100 банков КК с разветвленной сетью филиалов. В настоящее время широко проводятся трансплантации КК пациентам (в основном детям) с различными гематологическими, онкогематологическими и генетическими заболеваниями [13].

Одним из преимуществ КК по сравнению с другими источниками стволовых клеток является их меньшая иммунологическая реактивность вследствие фенотипической незрелости клеток, что обусловливает снижение риска реакции «трансплантат против хозяина» [6] и выраженности иммунных конфликтов при трансплантации КК. Данный факт чрезвычайно важен при использовании этой ткани в качестве аллогенного гемопоэтического трансплантата.

Попадая в организм реципиента, стволовые клетки продолжают делиться, выделять биологически активные вещества, подвергаться дифференцировке в ответ на стимулы. Высокий пролиферативный потенциал стволовых клеток позволяет в очень короткие сроки восстанавливать функцию поврежденного органа или ткани.

Примитивные гемопоэтические клетки могут быть обнаружены среди более зрелых с помощью идентификации определенных клеточных молекул на их поверхности. Типичным примером такой структуры является поверхностный гликофосфопротеин – CD34 [30], уровень экспрессии которого максимален на клеточной поверхности ранних гемопоэтических клеток.

Высокая пролиферативная активность и колониеобразующая способность ГСК связаны не только с разной степенью их зрелости, но и с их естественным микроокружением. Известно, что интенсивность пролиферации и скорость дифференцировки стволовых клеток определяются интегральным регуляторным воздействием многокомпонентной системы факторов роста и цитокинов, которые продуцируются как самими стволовыми клетками, так и клеточными элементами их матриксно-стромального микроокружения [4].

Кордовая кровь – уникальная биологическая субстанция, содержащая как клеточные элементы (эритроциты, лейкоциты и др.), так и плазму. Особенностью плазмы КК является наличие более 60 специфических плацентарных белков, выполняющих роль

ферментов, коферментов, гемопоэтинов, адаптогенов, рецепторов, факторов роста, иммунорегуляторных агентов, а также пептидов (в том числе и опиоидных), высокая гормональная насыщенность, высокий уровень витаминов и микроэлементов. Одним из наиболее функционально важных белковых компонентов КК является эритропоэтин, который регулирует эритропоэз и обеспечивает поддержание необходимого объема эритроцитарной массы в соответствии с потребностями организма в кислороде. Его концентрация в 2–3 раза превышает таковую в донорской крови. В связи с этим КК может рассматриваться как стимулятор эритропоэза.

Следовательно, несмотря на повышенное содержание многих био- и иммуностимуляторов в КК, они находятся в сбалансированных концентрациях и представляют собой мощный биологически активный комплекс, необходимый для развивающегося организма, а также нормализует обмен веществ при введении во взрослый организм [10].

Эритроциты кордовой крови имеют ряд структурно-функциональных особенностей, отличающих их от эритроцитов взрослых людей. Именно поэтому в современной педиатрической практике выхаживания недоношенных детей, а также при хирургической коррекции врожденных пороков развития у новорожденных первого месяца жизни, когда зачастую необходима трансфузия донорских компонентов крови [26], предпочтение отдается использованию кордовой крови. Кордовая кровь содержит, главным образом, фетальный гемоглобин (HbF), который отличается от гемоглобина взрослых людей и имеет повышенное сродство к кислороду. Благодаря этому фетальные эритроциты также могут быть использованы для трансфузии как взрослым пациентам, так и детям с различными легочными патологиями, гипоксическими состояниями, сердечно-сосудистыми заболеваниями. Фетальные эритроциты способствуют более быстрой нормализации газообмена в тканях и органах.

Расширение объемов трансплантации стволовых клеток КК связано с разработкой технологий их криоконсервирования и хранения в замороженном состоянии. Существует немало проблем, обусловленных подготовкой КК к длительному хранению и вы-

бором оптимальных технологий криоконсервирования ее образцов, а именно: целесообразность выполнения сепарации, использование различных криоконсервирующих сред и применение способов подготовки размороженных клеток к трансплантации.

1. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность стволовых гемопоэтических клеток кордовой крови до и после криоконсервирования с ДМСО

Для минимизации объемов суспензии клеток, которые хранятся в криобанке, а также для избежания развития гемолитической реакции при трансфузии клеточной взвеси, несовместимой по эритроцитарным антигенам (А, В, 0, резус и др.), и негативного влияния лизата эритроцитов на организм реципиента, образующегося при медленных скоростях замораживания, во всех ведущих банках кордовой крови проводят сепарацию ядросодержащих клеток (ЯСК), в состав которых входят и ГСК, из цельной крови. Следует отметить, что количество ГСК, получаемое при единичной заготовке, относительно небольшое. Поэтому, если потери клеточной массы КМ в процессе сепарации, криоконсервирования, размораживания и тестирования иногда допустимы до 40–50%, то для КК они могут приводить к «несостоятельности» трансплантата и рецидиву основного заболевания после пересадок. Учитывая ограниченный объем КК (не более 100 мл), небольшой процент стволовых клеток, который сильно варьирует и зависит от массы плода, протекания беременности, длины пупочного канатика и ряда других факторов, важным является заготовка максимально возможного количества крови и полное выделение ЯСК при сепарации с сохранением качества клеток. Этим обусловлена необходимость разработки эффективных методов получения, выделения, криоконсервирования и хранения клеток КК.

Важно отметить, что эффективность применения препаратов КК в клинике определяется не только достаточным количеством клеток, но и их структурно-функциональной полноценностью после размораживания. Поэтому необходима комплексная оценка структурно-функциональной полноценности и жизнеспособности

получаемого препарата на каждом этапе криоконсервирования с помощью различных современных методов тестирования.

На основании комплексного подхода к изучению структурно-функционального состояния клеток нами были разработаны безотмывочные технологии криоконсервирования клеток кордовой крови, в том числе и ГСК, с применением проникающих и непроникающих криопротекторов.

В настоящее время для сепарации стволовых гемопоэтических клеток из цельной кордовой крови используют следующие методы:

1. Выделение ЯСК в градиенте плотности фиколла. Сепарация в градиенте плотности позволяет получать преимущественно мононуклеарные клетки, но приводит к значительным потерям гемопоэтических предшественников (30–50%). Поэтому использование данного метода крайне нежелательно для сепарации ГСК из кордовой крови.

2. Седиментация эритроцитов и выделение ЯСК при использовании таких высокомолекулярных соединений, как раствор желатина, гидроксиэтилкрахмала, полиглюкина.

Для удаления эритроцитов и дальнейшего замораживания мы использовали полиглюкин (ПГ), так как он имеет ряд преимуществ перед другими веществами (фиколлом, желатином, гидроксиэтилкрахмалом и др.), которые применяются для выделения ЯСК КК. Во-первых, полиглюкин, как и аутологичная плазма КК, является достаточно благоприятной средой для клеток, во-вторых, он широко используется в трансфузиологии и не требует отмывания клеток перед использованием.

Анализ сохранности ЯСК, выделенных с помощью ПГ, показал, что данный метод позволяет выделять до 80% $CD45^+$-клеток из КК и до 90% гемопоэтических $CD34^+$-клеток. При использовании фиколла уже на этапе выделения наблюдаются потери не только $CD45^+$-клеток (так как фиколл выделяет преимущественно мононуклеары), но и потери $CD34^+$-клеток (около 30-40%).

Следует акцентировать внимание на том, что определение сохранности клеток является важным, но недостаточным тестом. В связи с этим был проведен анализ жизнеспособности ядросодержащих, в том числе и гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови.

К современным методам определения жизнеспособности клеток относится проточная цитофлуориметрия с применением особых флуоресцентных красителей, которые не проникают в клетки с неповрежденными мембранами или оценивают активность метаболизма. Клетки с поврежденными плазматическими мембранами или ослабленным метаболизмом не способны предотвратить проникновение красителей, которые, попав в клетку, связываются с внутриклеточными структурами и продуцируют высокофлуоресцентные аддукты, идентифицирующие клетки как «нежизнеспособные».

В работе мы определяли жизнеспособность клеток с помощью витального красителя 7-амино-актиномицина D (7AAD), который является аналогом актиномицина D и связывается с цитозиновыми и гуаниновыми основаниями ДНК [35]. При этом данный краситель проникает в клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза или некроза и имеющие повреждения мембраны, в то время как клетки с неповрежденной плазматической мембраной для него не доступны. Комплекс 7AAD-ДНК имеет максимум эмиссии при 647 нм.

Анализ жизнеспособности ЯСК показал (рис. 1), что жизнеспособность клеток, выделенных с помощью ПГ, не снижается, в отличие от клеток, выделенных в градиенте плотности фиколла, когда уже на этапе выделения наблюдается потеря жизнеспособности ЯСК: (7,6 ± 2,4)% $CD45^{+}7AAD^{+}$-клеток и (10,6 ± 4,2)% $CD34^{+}7AAD^{+}$-клеток.

Таким образом, метод выделения ЯСК с помощью ПГ позволяет сохранять количественный и, что особенно важно, качественный состав мононуклеаров КК, в том числе и стволовых $CD34^{+}$-клеток.

Полученные данные важны для последующих этапов криоконсервирования, так как известно, что состояние клеток на этапе перед криоконсервированием определяет результаты замораживания-отогрева. Значительная дестабилизация клеток при выделении фиколлом приведет к тому, что криоконсервированию будут подвергаться уже поврежденные клетки, следовательно, снизится их как устойчивость, так и жизнеспособность на этапах обработки криопротектором и замораживания-отогрева.

В связи с необходимостью создания банков пуповинной крови и полученных из нее клеточных препаратов разработка новых

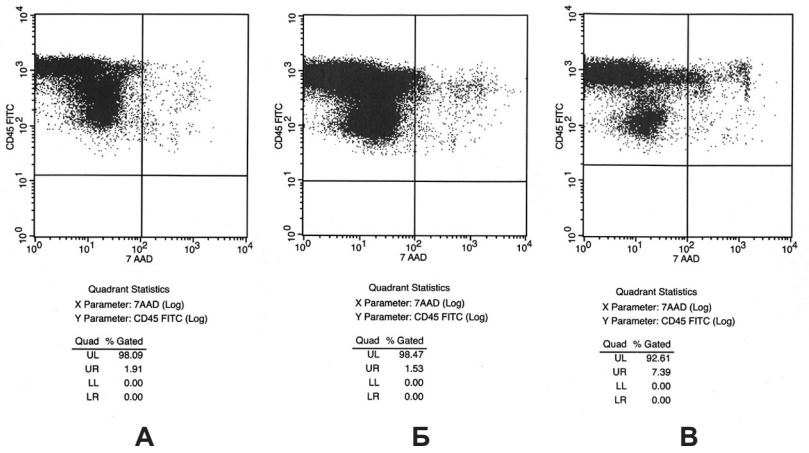


Рис. 1. Жизнеспособность CD45-клеток в концентратах, выделенных различными методами: А – цельная КК; Б, В – клетки, выделенные ПГ и фиколлом соответственно.

методов криоконсервирования является актуальной проблемой. В настоящее время для криоконсервирования ЯСК КК широко используется в качестве криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5–10%. Однако в силу своей токсичности в такой концентрации ДМСО должен удаляться перед инфузией. Удаление криопротектора после размораживания клеточной взвеси существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере в процессе отмывания части клеток, в том числе и ГСК (до 20%), что, в свою очередь, снижает клиническую эффективность препаратов КК.

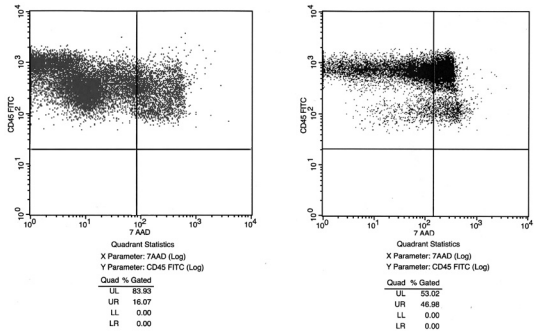
В связи с этим для криоконсервирования ЯСК КК необходимо использовать ДМСО в минимально допустимых концентрациях, что позволит вводить клеточную суспензию реципиентам без отмывания от криопротектора.

Разработанный нами способ криоконсервирования ЯСК КК заключается в предварительном концентрировании клеточной суспензии после выделения в объеме не более 10 мл методом двухэтапного центрифугирования и при медленном добавлении на

ледяной бане раствора ДМСО. Используемая четырехэтапная программа замораживания в сочетании с предлагаемым методом предобработки суспензии клеток позволяет снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5% и получить после размораживания высокий процент сохранных клеток: (81,2 ± 3,7)% для ЯСК и (89,2 ± 4,1)% для $CD34^+$-клеток. Сохранность же $CD45^+$- и $CD34^+$-клеток, выделенных в фиколле и замороженных аналогично, составляла (69,2 ± 4,6) и (59,1 ± 5,6)% соответственно.

Следует отметить, что жизнеспособность $CD45^+$-клеток, выделенных и криоконсервированных по нашему методу, составляла (82,7 ± 2,9)%, а клеток, выделенным фиколлом, – (52,4 ± 4,2)% (рис. 2). Жизнеспособность $CD34^+$-клеток составляла (93,5 ± 2,9)% при использовании нашего метода, а после криоконсервирования выделенных фиколлом клеток – (46,2 ± 4,1)%.

Поскольку популяция ЯСК $CD45^+$-клеток неоднородна и включает субпопуляции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, был проведен анализ перераспределения популяционного состава $CD45^+$-клеток до и после криоконсервирования. Оценка популяционного состава лейкоцитов ($CD45^+$-клеток) кордовой крови на стадиях криоконсервирования необходима для изучения изменений состава суспензии клеток в зависимости от условий замораживания, а также для определения криоустойчивости каждой из фракций.



А Б

Рис. 2. Жизнеспособность $CD45^+$-клеток после криоконсервирования: А – выделенные с помощью ПГ; Б – выделенные с помощью фиколла.

На рис. 3 представлен цитофлуориметрический анализ популяционного состава ЯСК КК, основанный на оценке как относительных размерных характеристик клеток (параметр FSC), так и степени внутренней неоднородности внутриклеточного содержимого (параметр SSC). Видно, что лимфоциты характеризуются минимальными значениями параметров FSC и SSC, а гранулоциты – максимальными.

Полученные результаты свидетельствуют, что потеря клеток при замораживании происходит в основном за счет гранулоцитов (табл.1). Видно, что относительное содержание лимфоцитов и моноцитов увеличивается, а гранулоцитов – снижается. При пересчете на абсолютное количество клеток в контроле потери гранулоцитов составляют 30%, моноцитов – до 4%, а лимфоцитов – до 2%.

Также был проведен анализ жизнеспособности различных популяций ЯСК после криоконсервирования (рис. 4).

Из рис. 4 видно, что снижается жизнеспособность общей популяции $CD45^+$-клеток в основном за счет гранулоцитов и составляет (69,8 ± 3,7)%, а мононуклеаров – 94–98%.

Известно, что важную роль в механизмах криозащиты ЯСК играет плазматическая мембрана. Под действием факторов крио-

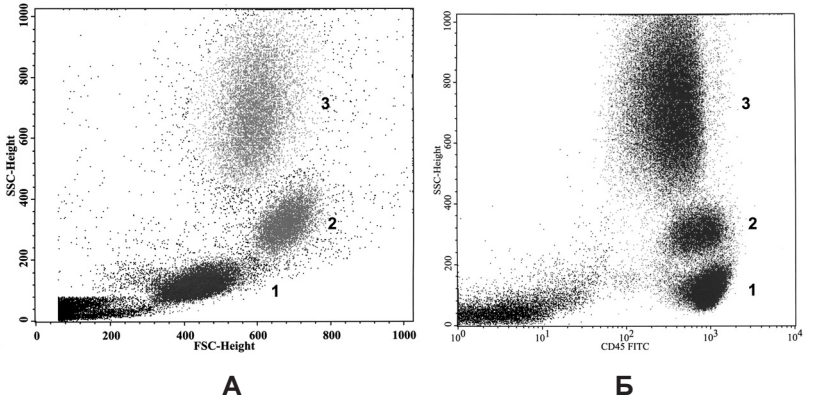


Рис. 3. Цитограммы популяционного состава ЯСК КК: А – распределение в координатах FSC/SSC; Б – распределение в координатах SSC/CD45 FITC (1 – лимфоциты; 2 – моноциты; 3 – гранулоциты).

Таблица 1. Содержание популяций ЯСК кордовой крови, выделенных разными методами, до и после криоконсервирования, % (M ± SE)

Клетки	Цельная КК	Выделение ПГ	Выделение фиколлом	Криоконсервирование ПГ + ДМСО	Криоконсервирование фиколл + ДМСО
Лимфоциты	34,8 ± 2,5	34,6 ± 1,7	70,7 ± 4,2	46,9 ± 2,3	75,5 ± 3,1
Моноциты	11,2 ± 2,1	11,1 ± 1,2	20,5 ± 2,1	15,3 ± 2,1	21,5 ± 1,2
Гранулоциты	53,4 ± 3,6	54,3 ± 2,6	8,8 ± 0,6	37,7 ± 3,7	3,0 ± 0,6

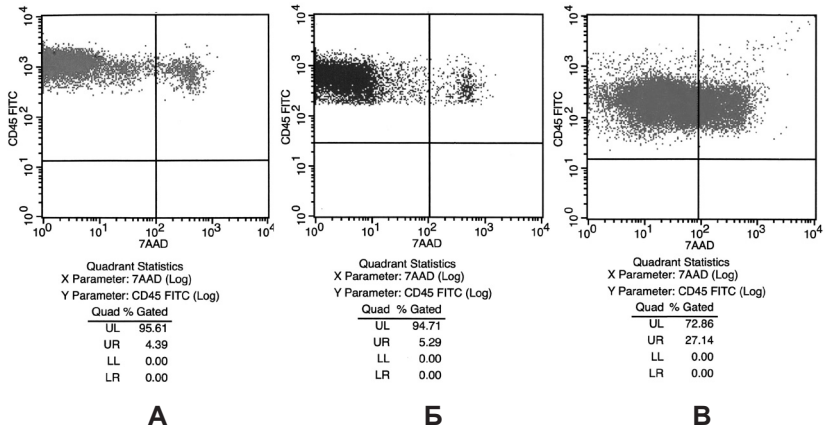


Рис. 4. Жизнеспособность популяций $CD45^+$-клеток после криоконсервирования: А – лимфоциты; Б – моноциты; В – гранулоциты.

консервирования может изменяться трансбислойное распределение липидов в мембране. Так, переход фосфатидилсерина (ФС) во внешний монослой мембраны (в норме расположен только на внутренней стороне) служит маркером апоптоза и сигнальным

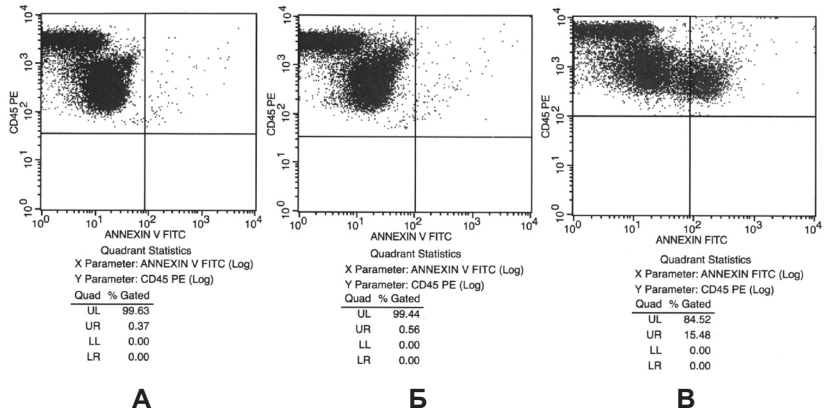


Рис. 5. Нарушение асимметрии мембран ЯСК до и после криоконсервирования: А – контроль; Б – выделенные ПГ; В – после криоконсервирования.

рецептором утилизации данных клеток макрофагами реципиента. То есть ЯСК, несущие на своей поверхности ФС, будут подвергаться активной элиминации макрофагами, что повлечет за собой низкую эффективность трансплантата.

В связи с этим были проведены исследования липидной асимметрии мембран ЯСК КК методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V – белка, который имеет высокое сродство к ФС и связывается с клетками, экспрессирующими его только на наружной поверхности мембраны. Показано, что в нативной крови содержание аннексин-меченых клеток составило от 0,5 до 1,5%, выделение и обработка криопротектором достоверно не изменили данный показатель (рис. 5).

После криоконсервирования клеток разработанным нами методом нарушение асимметрии было в среднем (7,3 ± 2,4)%, что свидетельствовало о сохранении структурной полноценности клеток. Следует отметить, что выделение ЯСК в градиенте плотности фиколла приводит к выраженной дестабилизации мембраны: количество аннексин V^+-клеток после выделения составляет (14,7 ± 3,1) и (25,2 ± 4,8)% после размораживания, что свидетельствует о

значительной дестабилизации клеток уже на этапе, предшествующем криоконсервированию (рис. 6).

Анализ липидной асимметрии в популяциях ЯСК, полученных и криоконсервированных нашим методом, показал, что под действием факторов криоконсервирования минимальные изменения наблюдаются у фракции мононуклеаров (лимфоциты, моноциты), а максимальные – у гранулоцитов (до 40%), что коррелирует с полученными данными относительно жизнеспособности клеток (рис. 7).

Для функциональной характеристики ГСК используют их способность создавать колонии зрелых форменных элементов крови в культуре. Анализ сформированных колоний позволяет идентифицировать и количественно оценивать типы клеток-предшественников, степень их дифференцировки. Учитывается количество клеток, способных образовывать колонии (колониеобразующие единицы – КОЕ) [4].

При культивировании клеток кордовой крови в среде «MethoCult» отмечена их функциональная и клоногенная активность как до, так и после криоконсервирования (рис. 8).

Клетки образовывали колонии, имеющие эритроидную, гранулоцитарную, макрофагальную и смешанную морфологию, что

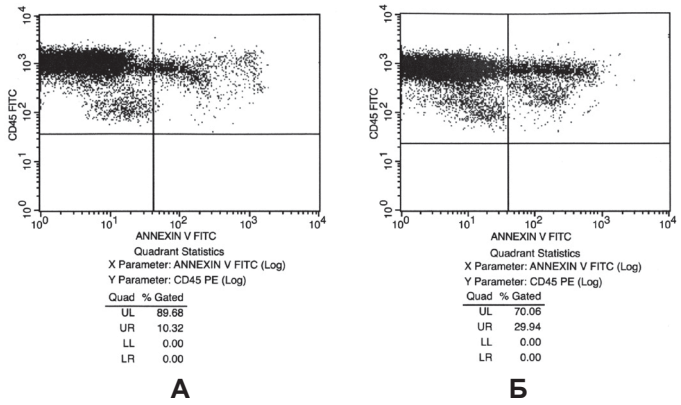


Рис. 6. Нарушение асимметрии мембран ЯСК, выделенных фиколлом до (А) и после (Б) криоконсервирования.

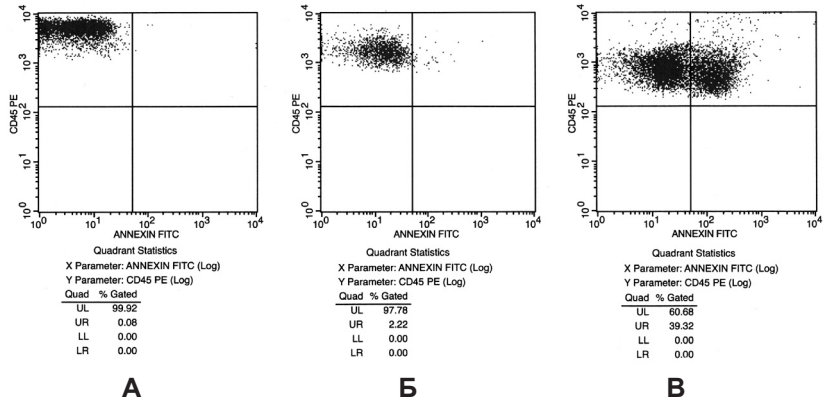


Рис. 7. Нарушение асимметрии мембран в популяциях $CD45^+$-клеток после криоконсервирования: А – лимфоциты; Б – моноциты; В – гранулоциты.

характерно для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников гемопоэтического ряда.

Общее количество колоний до и после криоконсервирования изменялось незначительно и составляло 228,6 ± 31,4 и 247,6 ± 36,8 соответственно.

После криоконсервирования наблюдалось некоторое увеличение количества колоний, которое связано с гибелью части гранулоцитов в процессе замораживания-отогрева, в то время как доля незрелых клеток-предшественников, способных образовывать колонии, увеличивалась.

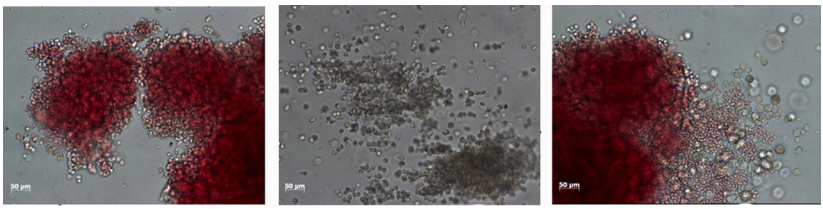


Рис. 8. Колонии клеток после криоконсервирования.

В ходе исследования влияния криопротектора на колониеобразующую активность клеток было выявлено, что присутствие ДМСО в среде не приводит к уменьшению количества образуемых колоний и изменению их морфологии. Процентное соотношение колоний разных типов до криоконсервирования и после размораживания приведено в табл. 2.

В следующей серии экспериментов были исследованы метаболические параметры ЯСК на каждом этапе криоконсервирования с использованием дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($DCFH_2$-DA). Проводилась оценка флуоресценции активной формы DCF, которая получается вследствие внутриклеточной реакции при участии эстеразы, отщепляющей от $DCFH_2$-DA диацильную группу. В результате нефлуоресцирующая форма $DCFH_2$ превращается в флуоресцирующую форму DCF под влиянием активного радикала кислорода – одной из так называемых активных форм кислорода (АФК) [1]. Анализ данных флуоресценции DCF позволяет выделить две зоны: высокой (High) и средней (Mid) интенсивности. Важно отметить, что процессы криоконсервирова-

Таблица 2. Количество колоний разных типов до и после криоконсервирования клеток кордовой крови, %, M ± SE

Группы	Тип колоний			
	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM
Контроль	13,8 ± 10,2	141,5 ± 78,1	71,1 ± 36,3	33,9 ± 13,1
Обработка ДМСО	9,1 ± 7,6	152,3 ± 53,6	85,2 ± 15,6	26,1 ± 12,7
После размораживания	16,3 ± 11,4	151,4 ± 47,4	56,1 ± 48,4	18,4 ± 8,5

ния по действию на клетки носят интегральный многофакторный характер, что может проявляться не только активацией образования свободных форм кислорода в клетках, а также его ингибированием, что определяется метаболическим состоянием клеток [2].

Следует отметить, что интенсивность флуоресценции DCF в клетках будет зависеть от их жизнеспособности. Так, при оптимальных условиях криоконсервирования количество клеток, находящихся в зоне интенсивной флуоресценции, может не изменяться, а при замораживании в неоптимальной комбинации криопротекторов или использовании неподходящего режима замораживания может наблюдаться снижение интенсивности флуоресценции DCF в клетках, что соотносится с их низкой сохранностью. Также отмечается перераспределение клеток после замораживания, что проявляется в увеличении их количества в зоне Mid.

Проведенные эксперименты показали, что добавление 5% ДМСО к ЯСК, выделенным ПГ или фиколлом, приводит к перераспределению регионов флуоресценции DCF. Большее количество клеток «сдвигается» в средний регион, что более характерно для ЯСК, выделенных ПГ (изменение флуоресценции на 8%). При исследовании интенсивности флуоресценции DCF в клетках, замороженных под защитой 5% ДМСО, видно, что как в зоне High, так и в зоне Mid изменения незначительны – 6–10% (рис. 9). Это свидетельствует о том, что как в процессе обработки, так и при замораживании ЯСК в этих условиях дополнительно не активируются процессы образования свободных форм кислорода [33]. При сравнении флуоресценции ЯСК, выделенных фиколлом и замороженных под защитой 5% ДМСО, видно, что интенсивность флуоресценции DCF в зоне Mid значительно повышается, а в зоне High снижается на 30%. Это можно объяснить тем, что ЯСК после выделения фиколлом находятся в дестабилизированном состоянии, которое характеризуется повышенной интенсивностью флуоресценции DCF, особенно в зоне High, что и является ответом клетки на повреждающее действие высокополимерного вещества – фиколла. При замораживании ЯСК, выделенных фиколлом, с 5% ДМСО возникают дополнительные физико-химические факторы, повреждающие клетки, а эти нарушения приводят к увеличению интенсивности флуоресценции DCF в зоне Mid.

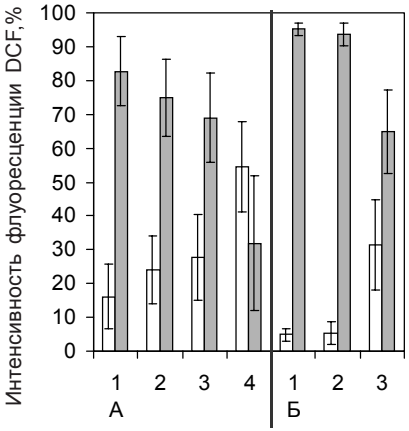


Рис. 9. Интенсивность флуоресценции DCF ЯСК КК до и после криоконсервирования с 5% ДМСО: А – выделенные полиглю-кином; Б – выделенные фиколлом (1 – контроль; 2 – обработка 5% ДМСО; 3 – замораживание в 5% ДМСО; 4 – замораживание без криопротектора; ☐ – зона Mid; ▩ – зона High).

Кроме того, мы использовали методический подход к измерению относительной флуоресценции меченых DCF клеток, при котором оценивали только изменение интенсивности флуоресценции DCF: как снижение, так и увеличение в зависимости от действующего на клетки фактора. Такие изменения относительной флуоресценции клеток, связанные с используемым криопротектором или криопротекторами, и после различных способов выделения и замораживания, позволяют понять, как модифицируются метаболические показатели клеток не только в зависимости от химических свойств среды, в которой находятся клетки, но и после замораживания-отогрева. Показано, что все $CD45^+$-клетки имеют минимальные изменения относительной флуоресценции при замораживании с 5% ДМСО на 4–6%. После замораживания клеток, выделенных фиколлом, в 5% ДМСО отмечены изменения флуоресценции на 26–29% (рис. 10). Наиболее выражены изменения относительной флуоресценции DCF при замораживании в полиглюкине без добавления 5% ДМСО (38–51%).

В дальнейших исследованиях необходимо было установить уровень флуоресценции DCF только у фракции нежизнеспособных клеток ($7AAD^+$), у которых после замораживания-отогрева в наибольшей степени изменялось метаболическое состояние. Для этого использовали метод оценки ЯСК с одновременным анализом

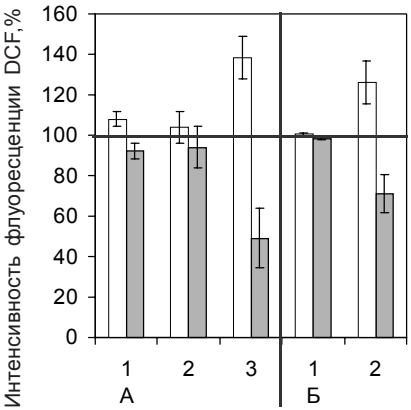


Рис. 10. Относительная флуоресценция DCF ЯСК КК до и после криоконсервирования под защитой 5% ДМСО: А – клетки, выделенные полиглюкином; Б – клетки, выделенные фиколлом (1 – обработка 5% ДМСО; 2 – замораживание в 5% ДМСО; 3 – замораживание без криопротектора; □ – зона Mid; ■ – зона High).

по двум флуоресцентным меткам: первая – 7AAD (оценивает жизнеспособность клеток), вторая – DCF (указывает на модификацию флуоресценции DCF после воздействия криопротекторов и низких температур). Такой методический подход позволяет выяснить механизм изменения интенсивности флуоресценции ЯСК, связанный с их жизнеспособностью в зависимости от условий обработки различными криопротекторами и последующего их замораживания-отогрева. На рис. 11 показано, что после замораживания с 5% ДМСО во фракции нежизнеспособных $7AAD^+$-клеток увеличивается количество клеток со сниженной интенсивностью флуоресценции DCF, что свидетельствует о их низкой способности генерировать АФК или может указывать на активизацию антиоксидантных процессов клетки в этих условиях.Следовательно, все нежизнеспособные $7AAD^+$-клетки имеют сниженный уровень метаболизма, связанный с продуцированием АФК.

Таким образом, разработанный метод криоконсервирования ЯСК КК, основанный на применении проникающего криопротектора ДМСО и новой четырехэтапной программы замораживания, позволил снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5% и минимизировать отрицательное воздействие физико-химических факторов криоконсервирования, сохраняя до 85% $CD45^+$-клеток и до 98% $CD34^+$-клеток в жизнеспособном состоянии. При этом

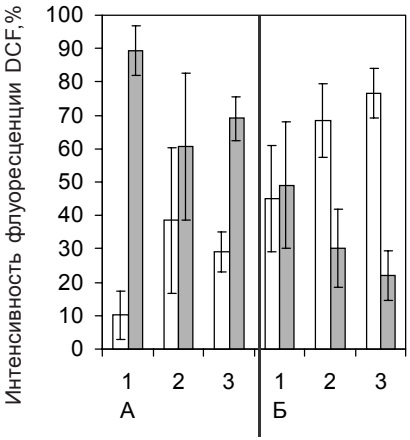


Рис. 11. Распределение 7AAD-меченых ЯСК КК между зонами Mid и High до и после криоконсервирования с 5% ДМСО: А – выделенные полиглюкином; Б – выделенные фиколлом (1 – обработка 5% ДМСО; 2 – замораживание в 5% ДМСО; 3 – замораживание без криопротектора; □ – зона Mid; ▨ – зона High).

основные потери ЯСК происходят за счет гранулоцитов. Анализ изменений липидной асимметрии мембран, функциональной и метаболической активности клеток на каждом этапе криоконсервирования свидетельствует о сохранении структурно-функциональных свойств ЯСК КК.

2. Влияние непроникающего криопротектора ПЭО-1500 и низких температур на сохранность и жизнеспособность ЯСК КК

Как отмечалось выше, наиболее широко распространенным методом для криоконсервирования ЯСК КК является использование проникающего криопротектора ДМСО [27]. Несмотря на то, что применение проникающих криопротекторов позволяет получать достаточно высокий процент жизнеспособных клеток после криоконсервирования, возникают серьезные трудности, связанные с необходимостью возвращения клеток в изотоническую среду и удаления криопротектора после размораживания. Это существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток. Поэтому наиболее перспективно создание безотмывочных методов криоконсервирования с использованием непроникающих в клетку криопротекторов. В настоящее время для криоконсервирования биообъектов используют такие

непроникающие криопротекторы, как сахароза, ПВП, декстраны, ПЭО и др., которые не требуют удаления после деконсервирования [16, 40].

Показано, что среди непроникающих криопротекторов наиболее эффективным для криозащиты эритроцитов как донорской [1], так и кордовой крови человека [3] является полиэтиленоксид с м. м. 1500 (ПЭО-1500). Однако при работе с данным криопротектором, как и с другими непроникающими криопротекторами, необходимо соблюдать определенные условия с целью избежания осмотического и температурного шока клеток. Поэтому были исследованы механизмы температурно-осмотической стабилизации клеток к действию криопротекторов и низких температур. На основании результатов фундаментальных исследований обоснованы новые подходы для направленной модификации структурно-функционального состояния клеток на начальных этапах перед криоконсервированием с целью повышения их устойчивости к замораживанию-отогреву. Определены оптимальные условия для структурной стабилизации клеток, заключающиеся в предварительной холодовой инкубации клеток и дозированном введении криопротектора. На основе принципа «холодовой» стабилизации разработан безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой непроникающего криопротектора ПЭО-1500 [3], который позволяет в значительной степени повысить устойчивость клеток к замораживанию-отогреву и сохранить их структурно-функциональные показатели на достаточно высоком уровне.

Поэтому в данной работе для разработки безотмывочных методов криоконсервирования суспензии ЯСК КК были применены описанные подходы.

Однако при использовании для криоконсервирования ПЭО-1500, который является высокомолекулярным осмотически активным соединением, использование других химических агентов для выделения не целесообразно. Поэтому для разделения КК на плазму, ЯСК и эритроциты нами был разработан метод двухэтапного центрифугирования с последующим фракционированием и разделением на эритроциты и концентрат ЯСК в аутоплазме, который затем подвергался обработке криопротектором и замораживанию [14].

Показано, что разработанный метод сепарации клеток позволяет выделять до 95% $CD45^+$-клеток и до 97% $CD34^+$-клеток, т. е. применение оригинального метода выделения для получения компонентов КК позволяет практически полностью сохранять количественный и качественный клеточный состав, особенно $CD34^+$-клетки.

В результате проведенных исследований был разработан безотмывочный метод криоконсервирования ЯСК кордовой крови, основанный на применении непроникающего криопротектора ПЭО-1500 в сочетании с «холодовой» обработкой клеток перед замораживанием и специальной, разработанной нами, двухэтапной программой замораживания. Данный безотмывочный метод позволяет сохранять после размораживания до 75% $CD45^+$-клеток и до 85% $CD34^+$-клеток. При этом их жизнеспособность составила около 85 и 95% соответственно (рис. 12).

Анализ популяционного состава лейкоцитов показал, что при инкубации клеток с криопротектором ПЭО-1500 и особенно в процессе криоконсервирования процентное содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов перераспределяется в сторону увеличения удельного содержания фракции мононуклеаров за счет снижения количества гранулоцитов (рис. 13).

Пересчет количества клеток в абсолютные значения свидетельствует, что разработанный метод криоконсервирования позволяет сохранять (95,2 ± 3,3)% лимфоцитов, (85,5 ± 4,9)% моноцитов и (48,4 ± 3,9)% гранулоцитов от первоначального их содержания в цельной кордовой крови.

При анализе жизнеспособности различных популяций ЯСК установлено максимальное значение у лимфоцитов ((95,8 ± 2,8)%), а минимальное – у гранулоцитов ((87,1 ± 5,9)%). Жизнеспособность моноцитов составляла (93,1 ± 4,7)%.

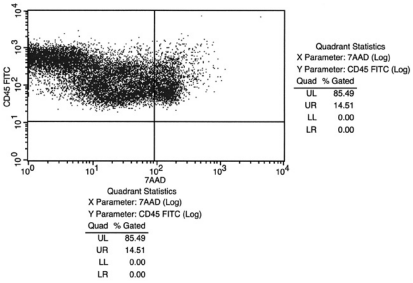


Рис. 12. Жизнеспособность $CD45^+$-клеток после криоконсервирования.

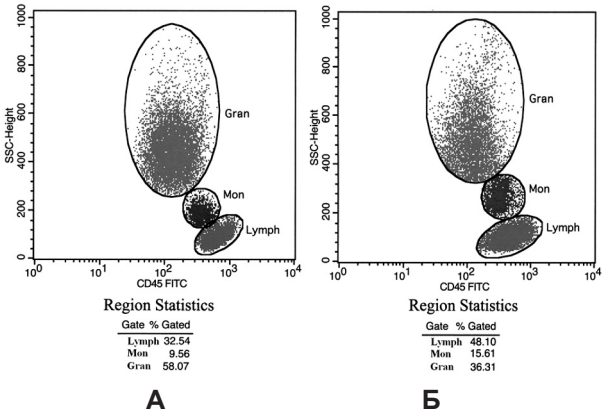


Рис. 13. Популяционный состав ЯСК КК до (А) и после (Б) криоконсервирования.

Исследование ЯСК КК методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V – белка, который имеет высокое сродство к ФС и связывается с клетками, экспрессирующими его на наружной поверхности мембраны, показало, что как выделение ЯСК методом двухэтапного центрифугирования, так и их обработка криопротектором не приводят к достоверным изменениям асимметрии и составляет (2,1 ± 0,4), (1,7 ± 0,2)% соответственно. В процессе криоконсервирования увеличивается число клеток с нарушенной асимметрией мембран до 10–12% ((10,9 ± 1,3)%).

Анализ популяционного состава клеток после криоконсервирования продемонстрировал, что нарушение распределения ФС у гранулоцитов максимально ((27,3 ± 3,9)%) и минимально у мононуклеаров (3–4%).

На следующем этапе работы изучали метаболизм клеток (образование АФК) на основных стадиях криоконсервирования: добавление криопротектора и замораживание в ПЭО-1500. При исследовании ЯСК с использованием DCF после выделения методом двухэтапного центрифугирования отсутствовала активация интенсивности флуоресценции, в то время как после обработки ПЭО-1500 наблюдались активизация продукции АФК и, как

следствие, рост интенсивности флуоресценции. Образование АФК зависит от сенсибилизирующего фактора, т. е. чем более выраженное воздействие на клетку, тем интенсивнее образуется АФК, что проявляется в увеличении количества DCF-меченых ЯСК.

В следующей серии экспериментов мы оценивали продукцию АФК после замораживания ЯСК с ПЭО-1500. Непроникающий криопротектор ПЭО-1500 может сам по себе является фактором, который активирует образование свободных форм кислорода как на этапе обработки, так и при замораживании.

Следует указать, что для криоконсервирования с ПЭО-1500 клеточную суспензию выделяли с помощью разработанного нами метода двухэтапного центрифугирования без использования других химических агентов (полиглюкина, фиколла). Это позволило сохранить ЯСК в стабильном состоянии [3]. Поэтому добавление полимерного вещества ПЭО-1500 к клеткам было первым значимым на них воздействием и вызывало незначительное повышение интенсивности флуоресценции DCF в зоне High. После замораживания в присутствии 10% ПЭО-1500 нами показан другой характер изменения интенсивности флуоресценции, который проявляется значительным увеличением числа клеток в зоне средней интенсивности Mid (в 2–15 раз) и существенным их снижением в 2–2,5 раза в зоне High (рис. 14).

Оценка относительной флуоресценции DCF в клетках показала, что добавление ПЭО-1500 к ЯСК может приводить к дополнительному окислительному стрессу (рис. 15), о чем свидетельствует увеличение относительного изменения количества клеток в регионе High на 6–8%. Это связано с тем, что в данном концентрате клетки еще не входили в значимый окислительный стресс в силу благоприятных условий их выделения центрифугированием без помещения в раствор полимерных соединений, поэтому относительная флуоресценция клеток практически не увеличивалась.

Только при переносе ЯСК в раствор ПЭО-1500 они активно продуцируют АФК. Для клеток, находившихся в неблагоприятных условиях (выделенные фиколлом) и обработанных ПЭО-1500, активация флуоресценции DCF практически не наблюдается, так как они уже подверглись значительному оксидативному стрессу при выделении.

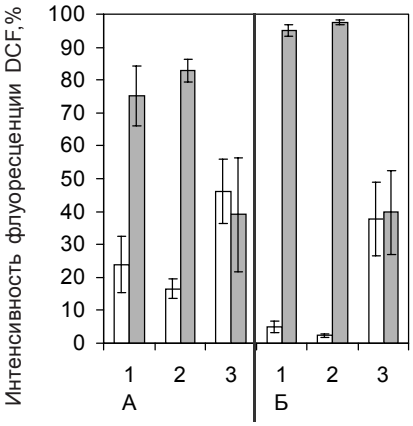


Рис. 14. Интенсивность флуоресценции DCF ЯСК КК до и после криоконсервирования с 10% ПЭО-1500: А – клетки, выделенные при двухэтапном центрифугировании; Б – выделенные фиколлом (1 – контроль; 2 – обработка 10% ПЭО-1500; 3 – замораживание в 10% ПЭО-1500; □ – зона Mid; ▨ – зона High).

Количественно наиболее выражены изменения относительной флуоресценции DCF в случае криоконсервирования клеток, выделенных фиколлом и замороженных в присутствии ПЭО-1500, при этом наблюдаются наибольшие изменения относительной флуоресценции (до 36–58%). Следует отметить, что и при выделении клеток двухэтапным центрифугированием и замораживании

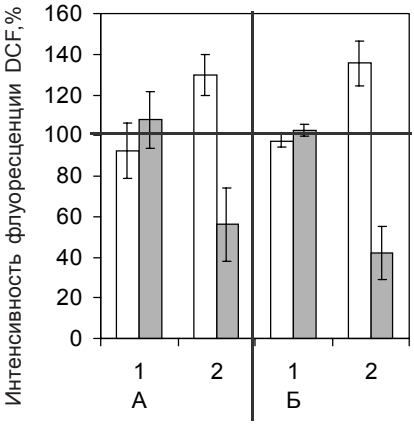


Рис. 15. Интенсивность относительной флуоресценции DCF ЯСК КК до и после криоконсервирования под защитой 10% ПЭО-1500: А – клетки, выделенные двухэтапным центрифугированием; Б – выделенные фиколлом (1 – обработка 10% ПЭО-1500; 2 – замораживание в 10% ПЭО-1500; □ – зона Mid; ▨ – зона High).

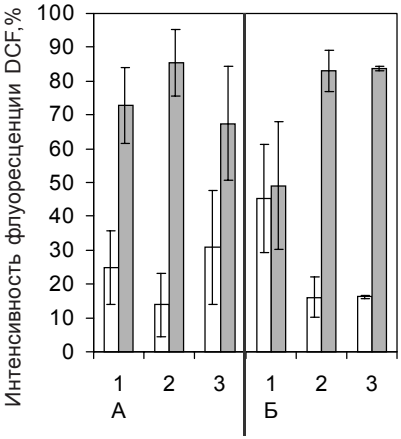


Рис. 16. Распределение 7AAD-меченых ЯСК КК между зонами Mid и High до и после криоконсервирования под защитой 10% ПЭО-1500: А – выделенные двухэтапным центрифугированием; Б – выделенные фиколлом (1 – контроль; 2 – обработка 10% ПЭО-1500; 3 – замораживание в 10% ПЭО-1500; ☐ – зона Mid; ▩ – зона High).

в ПЭО-1500 также наблюдаются значительные изменения относительной флуоресценции (30–44%). Это свидетельствует о существенном вкладе в метаболическое состояние клеток фиколла (вещество, которое используется для выделения) и полимерного криопротектора ПЭО-1500, что проявляется в активизации продукции свободных форм кислорода в клетках и, как следствие, в повышении флуоресценции DCF.

Также нами был использован анализ метаболических параметров ЯСК, при котором использовали две метки: 7AAD (оценивает жизнеспособность клеток) и DCF (указывает на изменение флуоресценции DCF после воздействия ПЭО-1500 и низких температур).

При анализе только фракции «нежизнеспособных» клеток после обработки ПЭО-1500 было показано (рис. 16), что количество ярко светящихся клеток (зона High) увеличивается с 75 до 87%. После замораживания-отогрева пропорция у $7AAD^+$-клеток изменяется незначительно: до замораживания соотношение Mid/High составляло 15/87%, а после – 31/69%.

Механизм, активирующий интенсивность флуоресценции DCF в $7AAD^+$-клетках под воздействием ПЭО-1500, более выражен у клеток, выделенных фиколлом и замороженных с ПЭО-1500

(рис. 16, Б). В этих условиях наблюдается изменение количества ярко светящихся клеток с 50 до 86%. Полученные данные свидетельствуют, что после обработки и замораживания с 10% ПЭО-1500 в нежизнеспособных ЯСК происходит активация образования АФК, что проявляется в изменении количества клеток с интенсивным свечением DCF.

Таким образом, предложена эффективная технология криоконсервирования концентрата ЯСК кордовой крови, в том числе и ГСК, основанная на оригинальном методе двухэтапного центрифугирования в сочетании с холодовой обработкой ПЭО-1500 и специально разработанной двухэтапной программой замораживания.

3. Безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови с ПЭО-1500: изучение структурно-функциональных свойств клеток

Ранее было показано [38], что эффективность экспансии, которая выражается в увеличении количества колониеформирующих клеток, была значительно выше в присутствии плазмы. То есть цельная кордовая кровь содержит благоприятное для экспансии микроокружение. Помимо этого доказано, что добавление плазмы кордовой крови к культуре клеток приводит к увеличению количества и размеров вторичных колоний клеток-предшественников КОЕ-ГЭММ (гранулоцитарно-эритроидно-мегакариоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц) в первичной колонии, а применение IL-3 и факторов плазмы стимулирует колониеобразование и увеличивает размер колоний в культуре.

Кроме того, трансфузиологи и неонатологи используют кордовую кровь в качестве источника эритроцитарной массы и плазмы для лечения и выхаживания недоношенных детей, а также для хирургической коррекции врожденных пороков развития у новорожденных первого месяца жизни [21]. Поскольку кровь новорожденных значительно отличается клеточным и биохимическим составом от крови взрослых людей, источником этих компонентов в подобных ситуациях может быть цельная кордовая кровь.

Следовательно, ЯСК КК являются уникальным физиологически сбалансированным препаратом, поскольку наряду с клеточными

элементами в ней содержатся все необходимые компоненты, позволяющие клеткам в полной мере выполнять свои функции.

Проблема криоконсервирования цельной КК достаточно сложная. Это связано с тем, что для криоконсервирования эритроцитов и ЯСК, входящих в ее состав, эффективны различные криопротекторы и режимы замораживания.

Так, общепринятым методом криоконсервирования эритроцитов является быстрое замораживание погружением в жидкий азот с использованием глицерина в конечной концентрации 15%. При замораживании ЯСК КК, в том числе и ГСК, в качестве криопротектора используется ДМСО.

Общепринятым способом криоконсервирования ЯСК является скорость охлаждения на первом этапе в пределах от 1–3 град/мин до –80°С с последующим погружением в жидкий азот. Иногда используют трехэтапное замораживание: скорость охлаждения на первом этапе (от 0 до –40°С) составляет 1 град/мин, на втором (до –120°С) – 5 град/мин, затем образцы погружают в жидкий азот.

Очевидно, что при криоконсервировании цельной кордовой крови с целью сохранения в ней всех типов клеток и биологически активных веществ плазмы могут быть использованы только безотмывочные технологии с применением непроникающих в клетки криопротекторов, которые не требуют удаления после размораживания.

Для решения задачи криоконсервирования цельной кордовой крови необходима разработка особых режимов, которые позволили бы сохранить в достаточной мере как форменные элементы, так и компоненты плазмы.

На основании проведенных фундаментальных исследований была разработана технология криоконсервирования цельной кордовой крови (далее режим КЦКК) с целью сохранения в ней как эритроцитов и плазмы, так и ЯСК, в том числе стволовых гемопоэтических. Такая технология предусматривает обработку крови криопротектором ПЭО-1500 при 0...4°С по специально разработанному нами режиму [15].

Данный режим позволяет сохранять после размораживания в препарате до 96% эритроцитов и до 70% ЯСК, в том числе около

83% $CD34^+$-клеток. Поскольку для банков КК минимально допустимым значением сохранности ЯСК является 60% [25], отметим, что замораживание цельной кордовой крови по разработанному нами методу позволяет получать высокие показатели сохранности и жизнеспособности клеток КК.

Показано, что криоконсервирование суспензии эритроцитов донорской крови под защитой ПЭО-1500 обеспечивает их сохранность на уровне 95–98% [1]. Сохранность же эритроцитов, замороженных по режиму КЦКК в составе цельной кордовой крови, составляет 96%, т. е. достоверно не отличается от сохранности выделенных донорских эритроцитов.

Оценка уровня гемолиза после размораживания эритроцитов недостаточна для определения дальнейшего поведения клеток в условиях кровеносного русла. Поэтому в следующей серии экспериментов была исследована устойчивость деконсервированных эритроцитов в физиологических условиях, моделирующих процесс трансфузии. Для этого использовали простую модель, воспроизводящую в эксперименте лишь основные принципы трансфузии: разбавление деконсервированной клеточной суспензии, которое происходит естественным путем в кровеносном русле реципиента; изоосмотичность окружающей среды и температура инкубации (37°С). Анализ сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева показал, что, несмотря на достаточно высокую выживаемость эритроцитов сразу после размораживания, перенос клеток в физиологические условия вызывает гемолиз определенной их части. Гемолиз эритроцитов после моделирования трансфузии, замороженных в составе цельной КК по разработанному режиму, составляет (18,4 ± 3,2)%, что также не отличается от гемолиза эритроцитов, криоконсервированных по оптимальному для них методу – прямым погружением в жидкий азот.

Ранее считалось, что степень посттрансфузионной выживаемости является основным критерием полноценности консервированных эритроцитов. Однако в свете последних данных о биохимии и физиологии гемоглобина, ухудшении дыхательной функции эритроцитов, подвергавшихся длительному гипотермическому хранению при 4°С, а также изменении их биофизических свойств

и формы, влияющих на сроки циркуляции введенных клеток, необходимо оценивать функциональные свойства эритроцитов более широко. Общепринятым критерием структурно-функциональной полноценности эритроцитов *in vitro* является содержание фосфоорганических соединений АТФ и 2,3-ДФГ, сохранность которых в процессе криоконсервирования очень важна. Известно, что высокая внутриклеточная концентрация 2,3-ДФГ позволяет ему принимать активное участие в поддержании осмотического и ионного баланса клеток, а физиологическое значение АТФ позволяет поддерживать все метаболические процессы на достаточном уровне.

Мы показали, что содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах как предварительно инкубированных в растворе ПЭО-1500, так и после размораживания сохраняется на уровне контроля, что свидетельствует о сохранении структурно-функциональной полноценности клеток (табл. 3).

Известно, что одной из наиболее криочувствительных структур клеток является мембрана. Согласно современным представлениям важную роль в механизмах криозащиты клеток с помощью

Таблица 3. Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах кордовой крови после обработки ПЭО-1500 при 0...4°С, а также после замораживания-отогрева, M ± SE.

Соединение	Содержание фосфоорганических соединений, мкМ/г Hb			
	до замораживания		после размораживания	
	Контроль	После обработки ПЭО-1500	Режим КЦКК	Замораживание погружением в жидкий азот
АТФ	3,95 ± 0,52	3,92 ± 0,25	3,77 ± 0,35	3,84 ± 0,34
2,3-ДФГ	13,3 ± 0,30	13,2 ± 1,27	13,05 ± 0,60	13,3 ± 0,26

непроникающих криопротекторов играет модификация структурно-функциональных свойств плазматической мембраны клетки, которая первой реагирует на изменение физико-химических параметров среды (понижение температуры, кристаллизация воды, изменения pH, повышение ионной и осмотической силы раствора). При этом перестройки в мембрано-цитоскелетном комплексе во многом будут предопределять устойчивость клеток к факторам криоконсервирования, т. е. в зависимости от направленности этих изменений может наблюдаться как увеличение устойчивости клеток, так и ее снижение. Взаимодействие цитоскелетных белков друг с другом, а также с мембранными компонентами основываются на так называемых «слабых связях» (ионных, водородных, гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых), поэтому изменение параметров среды может приводить к их модификации.

В условиях замораживания-отогрева и действия гипертонических растворов непроникающих криопротекторов может изменяться пространственное расположение белков цитоскелета [9, 8], сближаться отдельные участки белков спектрин-актиновой сети. Характер структурных изменений, возникающих в цитоскелетной белковой сети эритроцитов под влиянием криопротектора и замораживания-отогрева, можно оценить методом электрофореза в ПААГ, используя белок-сшивающие реагенты [19], которые позволяют прямо в клетке фиксировать изменения положения мембранных белков. Одним из наиболее часто используемых сшивающих агентов является диамид, который обладает способностью формировать дисульфидные мостики между SH-группами белков, находящимися на определенном друг от друга расстоянии, доступном для его действия.

На основании проведенных исследований по изучению белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов методом электрофореза в ПААГ можно заключить, что обработка суспензии клеток ПЭО-1500 и особенно криоконсервирование вызывают модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса, в том числе приводящих к критическому сближению макромолекул, что проявляется в образовании агрегатов на старте геля и изменении содержания белков в отдельных фрак-

циях (рис. 17). Также нельзя исключить влияние диамида и на другие белковые структуры, поскольку его действие не является высокоспецифичным. Данное утверждение может быть справедливо по отношению к белкам полос 7 и 8, поскольку нами было выявлено снижение их содержания в спектре белков.

Мы показали, что у эритроцитов КК, замороженной по разработанному нами методу, до и после размораживания количество белковых агрегатов составляло (4,5 ± 0,9) и (5,8 ± 0,8)% соответственно, а в контрольных эритроцитах – (3,3 ± 0,4)%.

Относительное увеличение содержания белка полосы 4.2, актина, белка полосы 6 после размораживания клеток, обработанных ПЭО-1500 при низких положительных температурах, свидетельствует о лучшей сохранности их нативной структуры в мембране эритроцитов и может способствовать повышению механической прочности и стабилизации клеток в условиях криоконсервирования.

Кроме того, все особенности, обнаруженные в тенях эритроцитов, замороженных по разработанному нами методу, полностью сопоставимы с результатами, полученными на тенях эритроцитов, замороженных в соответствии с оптимальным для данного вида клеток режимом – прямым погружением в жидкий азот.

Как было отмечено выше, плазма кордовой крови является уникальной биологической субстанцией. Для максимального и долгосрочного сохранения ее состава применяют методы низкотемпературного консервирования.

С целью изучения влияния криоконсервирования цельной кордовой крови по разработанному нами методу на сохранность гормонального статуса плазмы кордовой крови методом иммунофер-

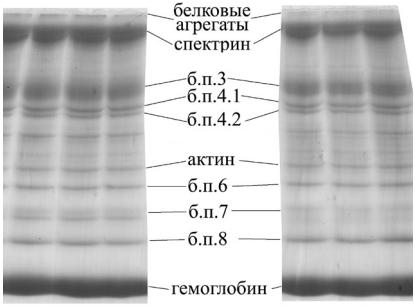


Рис. 17. Белковый спектр теней эритроцитов цельной кордовой крови, полученных с использованием сшивающего агента диамида.

ментного анализа определяли содержание тестостерона, трийодтиронина, тироксина, тиреотропного гормона и альфа-фетопротеина (АФП) (табл. 4).

Как свидетельствуют результаты проведенных нами исследований, низкотемпературное консервирование цельной кордовой крови по разработанному нами методу не влияет на содержание изучаемых биологически активных веществ плазмы кордовой крови, что позволяет сохранять их концентрацию на физиологически сбалансированном уровне.

При исследовании количества ЯСК КК, в том числе и гемопоэтических, до и после размораживания установлено, что разработанный метод криоконсервирования цельной КК позволяет сохранять после размораживания до 70% $CD45^{+}$-клеток.

Анализ субпопуляционного состава лейкоцитов после размораживания выявил перераспределение соотношения между лимфоцитами, моноцитами и гранулоцитами.

Поскольку при криоконсервировании перераспределяется процентное содержание основных популяций лейкоцитов, в следующей серии экспериментов мы анализировали сохранность каждой популяции после замораживания суспензии клеток. Если до крио-

Таблица 4. Содержание биологически активных веществ в плазме кордовой крови до и после криоконсервирования

Образец	Тестостерон, нМоль/л	Трийодтиронин, нМоль/л	Тироксин, нМоль/л	Тиреотропный гормон, МЕ/л	АФП, МЕ/л
Плазма донорской крови [12]	0,5–2,2 (женщины) 5,7–28,1 (мужчины)	1,2–2,8	60–160	0,5–4,0	0–10,4
Плазма КК	5,0 ± 1,37	1,1 ± 0,46	65,2 ± 17,35	4,7 ± 2,86	3300 ± 780
Плазма КК после криоконсервирования по режиму КЦКК	4,8 ± 1,25	1,1 ± 0,38	61,3 ± 14,47	4,6 ± 1,97	2950 ± 670

консервирования содержание популяции лимфоцитов составляло в среднем 38, моноцитов – 11 и гранулоцитов – 51%, то после размораживания – 63, 18 и 19% соответственно. Исходя из этого, можно заключить, что сохранность лейкоцитов снижается в основном за счет гибели гранулоцитов (рис. 18).

Сохранность ГСК составляла до 85%, что может свидетельствовать о их большей криоустойчивости по сравнению с $CD45^+$-клетками.

Определение сохранности клеток является важным, но недостаточным тестом, поскольку при сохранении структуры клетка может быть нежизнеспособной. В связи с этим мы провели анализ жизнеспособности ЯСК КК с применением 7AAD (рис. 19).

Анализ жизнеспособности $CD45^+$- и $CD34^+$-клеток после криоконсервирования по методу КЦКК показал, что в жизнеспособном состоянии сохраняется до 85,3% $CD45^+$-клеток и до 90% $CD34^+$-клеток. Следует отметить, что жизнеспособность $CD45^+$-клеток снижается за счет гранулоцитов, жизнеспособность популяции которых составляла 50%, а жизнеспособность лимфоцитарно-моноцитарной популяции – на 3–7% (рис. 19).

Сравнение устойчивости изучаемых популяций ЯСК к действию факторов криоконсервирования показало, что клетки гранулоцитарного ряда более чувствительны к воздействию низких темпе-

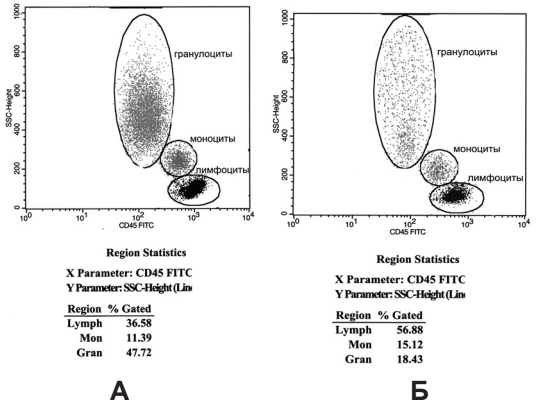


Рис. 18. Популяционный состав лейкоцитов до (А) и после (Б) криоконсервирования.

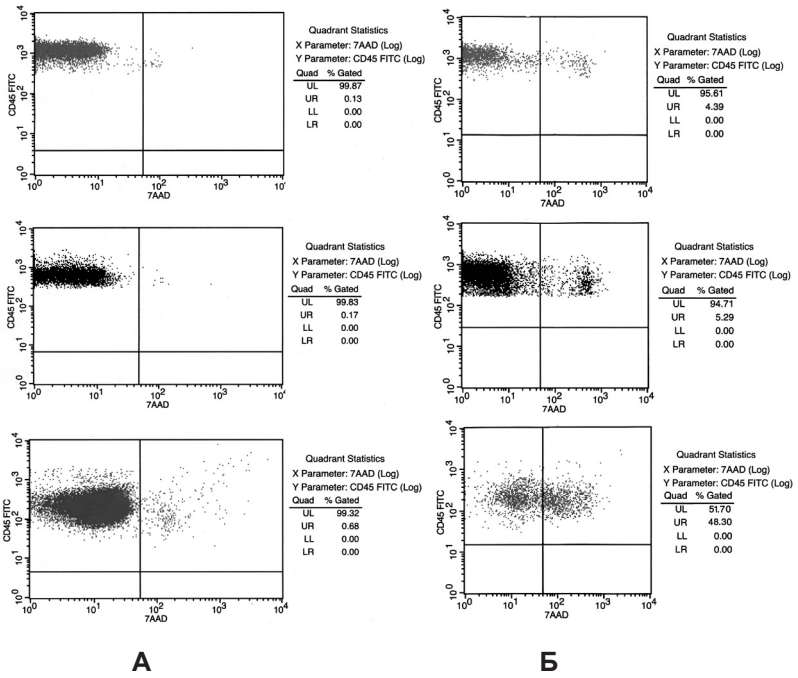


Рис. 19. Жизнеспособность популяций лейкоцитов: А – контроль, Б – криоконсервированные с ПЭО-1500.

ратур. Возможно, это связано с тем, что они содержат много лизосом, которые обладают большой чувствительностью к высоким концентрациям электролитов [31]. Известно, что в процессе криоконсервирования увеличивается концентрация растворенных веществ в клетке, что может вызывать деградацию лизосом. Вышедшие в большом количестве в цитоплазму кислые гидролазы разрушают структуру клеток, что приводит к гибели гранулоцитов. Также можно предположить, что выход гидролитических ферментов во внеклеточную среду после разрушения гранулоцитов может вызывать и деструкцию клеток других популяций.

Известно, что следствием замораживания-отогрева может быть гибель клеток в результате реализации каскадного механизма

апоптоза [39]. Начальная стадия апоптоза для клеток сопровождается потерей липидной асимметрии плазматической мембраны, приводящей к экспонированию ФС на поверхности клетки, который в норме располагается исключительно на внутренней стороне [24]. Экспонирование ФС в процессе апоптоза – универсальное явление, происходящее в большинстве, если не во всех типах клеток. Таким образом, использование аннексина V является адекватным методом дифференцировки клеток, находящихся на ранней стадии дисфункции мембраны или начальной стадии апоптоза.

В связи с этим нами была проведена оценка нарушения липидной асимметрии методом проточной цитофлуориметрии с использованием маркера аннексин V FITC.

На рис. 20 представлены цитограммы $CD45^+$-клеток, демонстрирующие связывание аннексин V с клетками до и после замораживания.

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что при криоконсервировании увеличивается количество аннексин V^+-клеток по сравнению с контролем.

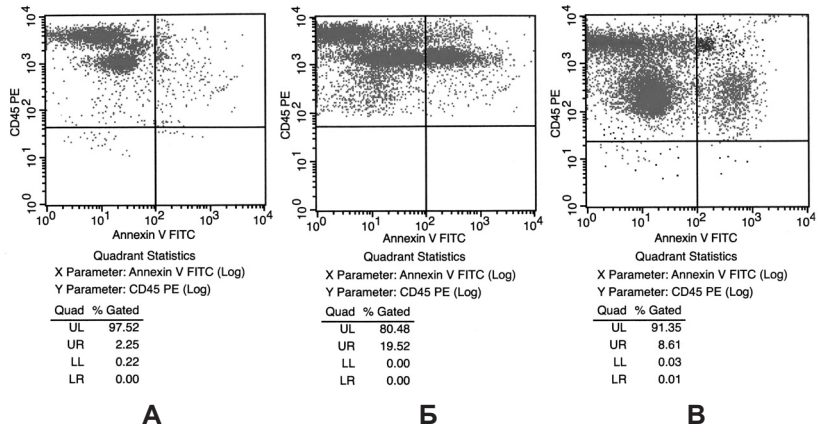


Рис. 20. Цитограммы связывания $CD45^+$-клеток с аннексином V: А – контроль; Б – замороженные согласно режиму КЦКК; В – замороженные с использованием скорости охлаждения 3 град/мин. Верхний правый квадрант демонстрирует количество аннексин V-меченых клеток.

Таблица 5. Количество аннексин V^+-клеток в популяциях ЯСК, M ± SE

Вид воздействия	Лимфоциты	Моноциты	Гранулоциты
Цельная КК	0,6 ± 0,40	0,9 ± 0,35	3,6 ± 1,06
Обработка КК ПЭО-1500 при 0...4°С	0,4 ± 0,18	0,7 ± 0,23	2,7 ± 0,47
Замораживание согласно режиму КЦКК	1,7 ± 0,34	8,8 ± 0,85	41,5 ± 4,82
Замораживание со скоростью охлаждения 3 град/мин	0	0,7 ± 0,22	18,2 ± 3,37

Отмеченные выше лучшие сохранность и жизнеспособность мононуклеаров по сравнению с гранулоцитами позволяют предположить, что и нарушение липидной асимметрии у этих популяций ЯСК в процессе криоконсервирования будет проявляться в различной степени. В качестве контроля было использовано замораживание с низкой скоростью охлаждения 3 град/мин, поскольку данный режим является оптимальным для замораживания ЯСК. Количество аннексин V^+-клеток в популяциях ЯСК представлено в табл. 5.

Наибольшее количество клеток с нарушенной асимметрией выявлено в популяции гранулоцитов. Поскольку известно, что инициаторами апоптического пути гибели клеток, начальной стадией которого является нарушение липидной асимметрии мембран, могут быть повреждения в результате криоконсервирования, поэтому можно сделать вывод о меньшей криоустойчивости данной популяции по сравнению с лимфоцитами и моноцитами.

Из представленных данных видно, что лишь у незначительной части лимфоцитов и моноцитов нарушается липидная асимметрия как при добавлении ПЭО-1500, так и при замораживании-отогреве. Количество аннексин V-меченых клеток достаточно большое в общей популяции клеток, что обусловлено их высоким процентом в популяции гранулоцитов.

G. Koopman *et al.* [29] в 1994 году и I. Vermes *et al.* [42] в 1995 году разработали цитофлуориметрический метод оценки стадий апоптоза клеток, основанный на использовании комбинации аннексина V с окрашиванием витальным красителем. На начальных стадиях апоптоза клеточная мембрана остается интактной, в то время как на поздних стадиях апоптоза/некроза она утрачивает свою целостность и становится проницаемой. Флуоресцентный ДНК краситель 7AAD легко проникает в клетки на поздних стадиях апоптоза или некроза, но он не может попасть в клетки на начальной стадии апоптоза с интактной мембраной. Данный метод позволяет идентифицировать следующие типы клеток: 1) жизнеспособные клетки, представляющие собой аннексин V^- $7AAD^-$-клетки; 2) клетки с нарушенной, но целостной мембраной (аннексин V^+ $7AAD^-$-клетки); 3) мертвые клетки (аннексин V^+7AAD^+-клетки) [35]. Цитометрический метод с использованием аннексина V был применен для исследования различных типов клеток и подтвержден такими методами определения апоптоза, как световая микроскопия, цитометрическое определение гиподиплоидного ядра, а также определение ДНК-фрагментов с помощью ДНК-электрофореза.

В работе мы использовали аннексин V и 7AAD для определения вышеуказанных типов клеток после замораживания крови по режиму КЦКК. В качестве контроля использовали замораживание с низкой скоростью охлаждения 3 град/мин, поскольку данный режим, как известно, является оптимальным для замораживания ЯСК.

На рис. 21 представлены цитограммы ЯСК цельной КК, а также после криоконсервирования в зависимости от режимов замораживания.

Установлено, что разработанный нами режим замораживания цельной кордовой крови позволяет сохранять до 77% аннексин V^- $7AAD^-$-клеток, что всего на 3–5% меньше, чем при замораживании ЯСК по оптимальному для них режиму (табл. 6).

Поскольку в состав ЯСК входят такие разнородные в морфофункциональном отношении клетки, как лимфоциты, моноциты и гранулоциты, представляло также интерес дифференцировать количество ранних апоптических, поздних апоптических/некротических клеток в каждой популяции до и после криоконсервирования различными методами. Наибольший интерес представляло опре-

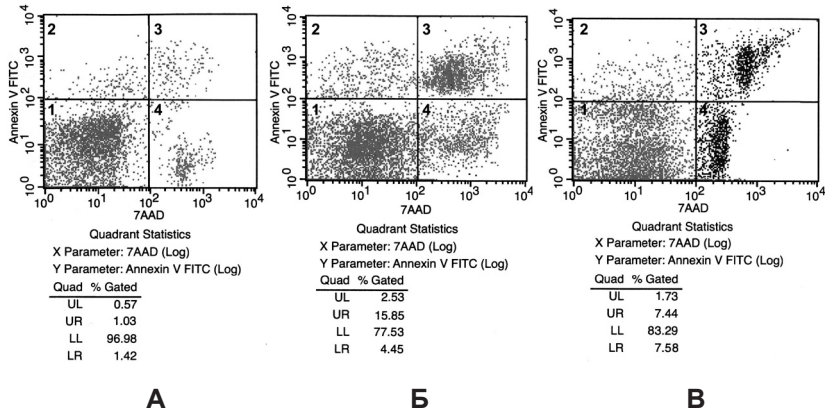


Рис. 21. Цитограммы ЯСК кордовой крови до и после криоконсервирования: А – ЯСК цельной КК; Б – криоконсервированные по режиму КЦКК; В – криоконсервированные со скоростью 3 град/мин (1 (нижний левый квадрант) – жизнеспособные клетки; 2 (верхний левый квадрант) – ранние апоптические клетки; 3 (верхний правый квадрант) – мертвые, поздние апоптические/некротические клетки; 4 (нижний правый квадрант) – мертвые некротические клетки и клетки с дезорганизованной мембраной).

Таблица 6. Влияние режима замораживания на связывание ЯСК с аннексином V и 7AAD, M±SE

Вид воздействия	Аннексин V^- $7AAD^-$-клетки	Аннексин V^+ $7AAD^-$-клетки	Аннексин V^+ $7AAD^+$-клетки	Аннексин V^- $7AAD^+$-клетки
Цельная КК	96,8 ± 0,71	0,8 ± 0,19	1,5 ± 0,56	0,9 ± 0,29
Обработка КК ПЭО-1500 при 0...4 °С	98,2 ± 0,26	1,0 ± 0,26	0,6 ± 0,20	0,2 ± 0,05
Замораживание согласно режиму КЦКК	76,8 ± 1,88	2,8 ± 0,35	16,1 ± 1,74	4,3 ± 0,63
Замораживание со скоростью охлаждения 3 град/мин	83,9 ± 3,73	1,3 ± 0,40	7,8 ± 1,42	6,5 ± 1,63

Таблица 7. Влияние режима замораживания на связывание аннексина V и 7AAD с клетками различных популяций

Популяции клеток		Цельная КК	Обработка КК ПЭО-1500 при 0...4 °С	Замораживание согласно режиму КЦКК	Замораживание со скоростью охлаждения 3 град/мин
Аннексин V^+ $7AAD^-$-клетки	лимфоциты	0,3 ± 0,17	0,3 ± 0,13	0,6 ± 0,07	0
	моноциты	0,6 ± 0,26	0,6 ± 0,15	4,9 ± 0,85	0,2 ± 0,04
	гранулоциты	1,0 ± 0,26	1,4 ± 0,55	3,9 ± 0,57	3,1 ± 0,50
Аннексин V^+ $7AAD^+$-клетки	лимфоциты	0,3 ± 0,24	0,1 ± 0,06	1,1 ± 0,29	0
	моноциты	0,3 ± 0,11	0,2 ± 0,08	3,9 ± 0,91	0,5 ± 0,12
	гранулоциты	2,6 ± 0,91	1,3 ± 0,37	33,4 ± 2,87	19,1 ± 2,91
Аннексин V^- $7AAD^+$-клетки	лимфоциты	98,6 ± 0,43	99,3 ± 0,22	91,1 ± 1,34	95,1 ± 2,02
	моноциты	98,2 ± 0,74	98,8 ± 0,24	87,8 ± 1,11	92,4 ± 2,83
	гранулоциты	95,4 ± 1,03	96,2 ± 0,44	55,8 ± 3,40	72,0 ± 3,60

деление аннексин V^-7AAD^--клеток в каждой из популяций, так как именно эти клетки в полной мере смогут выполнять свои функции при попадании в организм реципиента.

Данные относительно влияния режимов замораживания на уровень связывания аннексина V и 7AAD с отдельными популяциями ЯСК представлены в табл. 6.

Анализируя процент жизнеспособных (аннексин V^- $7AAD^-$) клеток в каждой из популяций в зависимости от режима замораживания, можно отметить, что в целом тенденции сохранности клеток каждой из популяций одинаковы, т. е. процент аннексин V^- $7AAD^-$-клеток гранулоцитарного ряда значительно меньше по сравнению с лимфоцитами и моноцитами (табл. 7).

Таким образом, замораживание цельной кордовой крови по разработанному нами режиму обеспечивает сохранность значительного количества аннексин V^-7AAD^--клеток, что сопоставимо с результатами медленного замораживания выделенных ЯСК КК.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2001. – №1. – С. 35–41.
2. Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М. и др. Оценка продукции активных форм кислорода ядросодержащими клетками пуповинной крови на этапах криоконсервирования // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 3. – С. 50–54.
3. Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М. и др. Новые методы криоконсервирования кордовой крови человека под защитой непроникающего криопротектора полиэтиленоксида м. м. 1500 // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 556–560.
4. Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Скляренко Л.М., Нагорная В.А. Стволовые кроветворные клетки и клетки-предшественники миелопоэза. – К.: МОРИОН, 1998. – С. 25–41.
5. Гольцев А.Н., Калиниченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 1. Характеристика гемопоэтического потенциала // Проблемы криобиологии. – 1998. – №1. – С. 3–24.
6. Гольцев А.Н., Калиниченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. – 1998. – №2. – С. 3–21.
7. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование). – К.: Наук. думка, 1988. – 192 с.
8. Землянских Н.Г., Зубов П.М., Бабийчук Л.А. Изменения белкового состава в мембраноцитоскелетном комплексе эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №1. – С. 3–15.
9. Зубов П.М., Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Модификация белкового состава мембраноцитоскелетного комплекса эритроцитов под влиянием ПЭО-1500 // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №2. – С.164–175.
10. Морозова Р.П., Козулина Е.П., Николенко И.А. Плацента – источник биологически активных веществ // Укр. биохим. журнал. – 1999. – Т. 71, №4. – С. 21–29.
11. Окулов В.Б., Афанасьев Б.В. Иммунологические аспекты трансплантации костного мозга // Вопросы онкологии. – 1992. – Т. 8, №4. – С. 387–396.
12. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы. – М.: Изд-во «Мокеев», 2002. – 288 с.
13. Трахтман П.Е., Балашов Д.Н., Щипицына И.П. и др. Использование пуповинной крови при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток у детей со злокачественными и незлокачественными заболеваниями системы крови // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 1, №3. – С. 80–83.
14. Пат. України № 23499, МКК C12N5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.В. Рязанцев, О.Л. Зубова, В.І. Грищенко; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – №200700585; заявл. 22.01.2007; опубл. 25.05.2007, Бюл. №7.
15. Пат. України № 80062, МКК A01N1/02. Спосіб кріоконсервування цільної кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – №200602122; заявл. 27.02.06; опубл. 10.08.07, Бюл. №12.

16. Пат. України №30888А, МКК 6А01N1/02. Спосіб консервування еритроцитів / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, С. Суміда та ін.; №98063123; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. – заявл. 16.06.98; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7.
17. Bass D. A., Parce J. W., Dechatelet L. R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation // J. Immunol. – 1983. – Vol. 130, №4. – P. 1910–1917.
18. Bauer C. Erythropoietin – from gene structure to therapeutic applications // J. Perinat. Med. – 1995. – Vol. 23, №1–2. – P. 77–81.
19. Becker R.E., Cohon C.M., Lux S.E. The effect of mild diamid oxidatoin on the structure and function of human erythrocyte spectrin // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 621, №10. – P. 4620–4628.
20. Broxmeyer H.E., Kurtzberg J., Glucman E. et al. Umbilical cord blood hematopoetic stem and repopulating cells in human clinical transplantation // Blood cells. – 1991. – Vol. 17, №2. – P. 313–329.
21. Brune T., Garritsen H., Witteler R. et al. Autologous placental blood transfusion for the therapy of anaemic neonates // Biol. Neonate. – 2002. – Vol. 81, №4. – P. 236–243.
22. Cairo M.S., Wagner J.E. Placental and /or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation // Blood. – 1997. – Vol. 90, №2. – P. 4665–4678.
23. Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch S.C. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes // Cell Death Differ. – 1998. – Vol. 5, №7. – P. 551–562.
24. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // J. Immunol. – 1992. – Vol. 148. – P. 2207–2216.
25. Fraser J., Cairo M.S., Wagner E. et al. Cord blood transplantation study (COBLT): cord blood bank standard operating procedures // J. Hematother. – 1998. – Vol. 7, №6. – P. 521–561.
26. Garritsen H., Brune T., Louwen F. et al. Autologous red cells derived from cord blood: collection, preparation, storage and quality controls with optimal additive storage medium (Sag-mannitol) // Transfusion Medicine. – 2003. – Vol. 13, №5. – P. 303–310.
27. Gluckman E. Sources of haemopoietic stem cells for alogeneic transplantation // Blood and Marrow Transplantation: The EBMT Handbook. – Craddock: ESH.EBMT. – 1998. – P. 88–96.
28. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood // Blood. – 1974. – Vol. 43, №3. – P. 357–361.
29. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis // Blood. – 1994. – Vol. 84, №5. – P. 1415–1420.
30. Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I. et al. CD34: structure, biology, and clinical utility // Blood.– 1996. – Vol. 87, №1. – P. 1–13.
31. Lee D., Allen C., Lee D. The effect of increasing concentrations of potassium chloride on rat liver lysosomes // Biochem. J. – 1972. – Vol. 128, №4. – P.142.
32. Lelkens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al. Stability after thawing of red blood cells frozen with high- and low-glycerol method // Transfusion. – 2003. – Vol. 43, №2. – P. 157–164.
33. Mykhailova O.O., Zubov P.M. Assessment of safety, viability and metabolic activity of the hematopoietic stem cells preparation of cord blood // Book of abstracts of 18th International Student Congress of (Bio)Medical Sciences. – Groningen (Netherlands), 2011. – P. 363
34. Pegg D.E. Long-term preservation of cells and tissues: a review // J. Clin. Path. – 1976. – Vol. 29, №4. – P. 271–285.
35. Philpott N.J., Turner A.J., Scopes J. et al. The use of 7-aminoactinomycin D identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques // Blood. – 1996. – Vol. 87, №6. – P. 2244–2251.
36. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, №22. – P. 10119–10122.
37. Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W. et al. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood. – 1993. – Vol. 81, №7. – P. 1679–1690.

38. Ryu K.H., Shin H.Y., Ahn H.S. et al. Comparison of efficiency of whole blood, mononuclear cells and purified $CD34^+$ cells from human umbilical cord blood // Haematologica. – 2004. – Vol. 89, №5. – P. 606–607.
39. Schmidt-Mende J., Hellstrom-Lindberg E., Joseph B. et al. Freezing induces artificial cleavage of apoptosis-related proteins in human bone marrow cells // J. Immunol. Meth. – 2000. – Vol. 245, №1–2.– P. 91–94.
40. Sputtek A., Pieper N., Giese L.H., Kuehnl P. Effect of electrolyte medium on post-thaw recovery and post–thaw stability of erythrocytes (RBC) frozen in presence of hydroxyethyl starch (HES) // 38^{th} Ann. Meet. of the Soc. for Cryobiology. – Edinburgh, 2001. – P. 138.
41. Traineau R., Dal Cortivo L. Cord blood bank-unrelated transplants // Transfus. Clin. Biol. – 1998. – Vol. 5, №1. – P. 56–63.
42. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol. 184, №1. – P. 39–51.

Индукция эффектов перекрестной адаптации при помощи оксидативного стресса для повышения эффективности криоконсервирования биологических объектов

В.Д. Зинченко[1]*, И.А. Белых[2],
И.А. Буряк[1], И.П. Горячая[1], И.В. Говор[3]

[1]Отдел криобиофизики
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: vd_zin@mail.ru*
[2]Кафедра «Биотехнология и аналитическая химия»
НТУ «Харьковский политехнический институт»
ул. Фрунзе, 21, г. Харьков, Украина 61002
[3]Отдел органических люминофоров и красителей
НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины
пр. Ленина, 60, г. Харьков, Украина 61178

Стресс-реакции присущи всем живым организмам. Они возникают при воздействии сильного раздражителя и играют защитную роль, направленную на нейтрализацию последствий, вызванных действием раздражителя. Процессы адаптации к стрессу формируют способность живых систем существовать в изменяющихся условиях внешней среды. При реализации процессов адаптации нередко появляется отсутствовавшая ранее устойчивость живой системы к другим раздражителям (явление перекрестной адаптации). Например, гипотермия используется в хирургии для повышения устойчивости организма к ишемическому или гипоксическому инсульту [34]. Способность к адаптации в ответ на резкое изменение внешних условий или действие различных

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 271–293.
© В.Д. Зинченко, И.А. Белых, И.А. Буряк и др., 2012

цитотоксичных агентов характерна не только для организма в целом, но и для изолированных органов, тканей и клеток [31].

Оксидативный стресс развивается в живых системах при нарушении равновесия между процессами окисления и антиоксидантной защиты. В норме в клетке постоянно образуются свободные радикалы и активные формы кислорода, а развитие процессов окисления сдерживается системой антиоксидантной защиты, включающей низкомолекулярные антиоксиданты и ферменты. При различных внешних воздействиях может происходить сдвиг этого равновесия в сторону окислительных процессов, и тогда развивается оксидативный стресс. Такие воздействия могут вызывать сильные окислители или вещества, нарушающие работу системы антиоксидантной защиты [43]. Одной из особенностей про-/антиоксидантного равновесия является то, что оно может возникать в ответ на действие различных стрессорных факторов как один из неспецифических признаков стрессовой реакции [2, 30]. В настоящее время высказывается предположение о том, что поддержание этого равновесия является также инструментом, с помощью которого клетка может регулировать многие процессы роста и адаптации [25, 42].

Некоторые общебиологические закономерности адаптивного ответа биологических объектов на оксидативный стресс были первоначально выявлены при изучении реакции на него микроорганизмов.

Установлено, что адаптивный ответ на оксидативный стресс у бактерий сопровождается синтезом многих белков, которые синтезируются и при других видах стресса (например, белок теплового шока). Синтез белков *de novo*, как необходимая стадия адаптивного ответа на стресс, указывает на то, что такие белки необходимы для адаптации и что данная реакция является неспецифическим ответом живой системы на стресс [22].

Имеются данные о том, что инкубирование клеток теплокровных животных и человека в среде с малым количеством оксиданта повышает их резистентность к последующему действию высоких доз оксиданта, летальных для клеток без такой предобработки [22, 43].

Оксидативный стресс вызывает перекрестную адаптацию живых систем и к другим повреждающим агентам: ионизирующему

излучению, тепловому шоку, альдегидам, тяжелым металлам и др.[20, 31, 40].

Анализ информации о перекрестной адаптации живых систем к различным видам стресса в ответ на действие индукторов оксидативного стресса дал нам основание для использования данного свойства в криобиологии с целью повышения устойчивости биологических объектов к факторам криоконсервирования. В связи с этим было изучено действие оксидативного стресса на клетки дрожжей и эритроциты при холодовых воздействиях, а также при моделировании условий, возникающих в процессе криоконсервирования клеток.

Оксидативный стресс вызывали при помощи озона. Озон, как индуктор оксидативного стресса, был выбран из следующих соображений: озон разрешен как терапевтическое средство во многих странах, в том числе и в Украине; озон как аллотропическая форма кислорода распадается до обычного кислорода, поэтому нет необходимости выведения его из биологического материала; озон легко вводить в биологический материал, поскольку он растворяется в воде и в физиологическом растворе, а его концентрация достаточно просто измеряется спектроскопическим методом.

Озон получали путем электросинтеза, пропуская газообразный кислород через изготовленный нами озонатор барьерного типа [10]. Концентрация озона в полученной озоно-кислородной смеси составляла 50 мг/л. Озон растворяли в дистиллированной воде или физиологическом растворе путем барботирования озоно-кислородной смесью при температуре тающего льда до достижения концентрации озона в растворе 10 мг/л. Концентрацию растворенного озона определяли спектрофотометрическим методом на приборе Specord UV VIS по значению экстинции на полосе Хартли [5].

Адаптивный ответ клеток на оксидативный стресс при отсутствии холодовых воздействий

Воздействие индукторов оксидативного стресса в низких концентрациях на делящиеся клетки в культуре во многих случаях стимулирует рост и деление клеток. Этот митогенный эффект наблюдали, например, после экспозиции фибробластов человека в растворе с перекисью водорода в концентрации 3–15 мкмоль/л

(от 0,1 до 0,5 мкмоль/ 10^7 клеток) [16–18, 45]. Эффект стимуляции роста при концентрации перекиси водорода, близкой по порядку величины к указанному выше значению, наблюдали также на бактериях и дрожжах [21, 26, 27].

Озон в подобных экспериментах в качестве индуктора оксидативного стресса ранее не использовался. Поэтому первым этапом данной работы было выяснение самого факта существования митогенного эффекта под действием озона. Исследования проводили на бактериях *Esherichia coli*. Изучали влияние озона на рост бактерий *E. coli* без замораживания. Бактерии *E. coli* высевали в колбы со средой М9 ($NaNO_3$ 0,5 г/л; $(NH_4)_2SO_4$ 0,05 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 г/л; CH_3COONa 10 г/л; NaH_2PO_4 0,5 г/л) [7]. В среду М9 сразу после высевания бактерий добавляли озонированный физиологический раствор с концентрацией растворенного озона 10 мг/л для достижения «начальной концентрации» озона в среде от 0,0013 до 0,62 мг/л. Поскольку озон, вступая в реакцию с биологическим материалом, очень быстро расходуется, то мы говорим о начальной его концентрации в момент введения в биологический материал. После введения озона бактерии культивировали на качалке при температуре 36°С в течение 6 ч. На рис. 1 приведены кинетические кривые роста бактерий *E. coli* при добавлении в ростовую среду озона в различных начальных концентрациях.

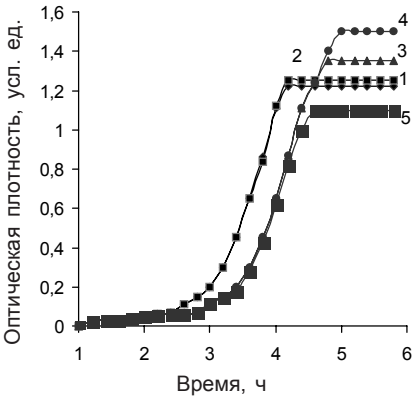


Рис. 1. Кинетические кривые роста бактерий *E. coli* при добавлении в ростовую среду озона в различных начальных концентрациях (мг/л): 1 – контроль (без озона); 2 – 0,0013; 0,013; 0,062; 3 – 0,12 ; 4 – 0,35 ; 5 – 0,57 (различие оптической плотности между кривой 1 (контроль) и кривыми 3–5 достоверны, между кривой 1 и 2 – недостоверно). Начальная концентрация введенного озона на всех рисунках приведена в расчете на единицу объема ростовой среды.

При низких начальных концентрациях озона (0,0013, 0,13 и 0,062 мг/л и меньше) кинетические кривые роста бактерий в пределах погрешности эксперимента не отличаются от кинетической кривой контрольного образца бактерий, не обработанных озоном. Эффект стимуляции роста бактерий, максимально выраженный в стационарной фазе роста, наблюдается при начальных концентрациях озона 0,12 и 0,35 мг/л. Озон в начальной концентрации 0,57 мг/л вызывает ингибирование роста бактерий [1, 8].

На рис. 2 представлены величины эффекта разных начальных концентраций озона на рост бактерий *E. coli* в логарифмической фазе роста.

При начальных концентрациях 0,12 и 0,35 мг/л озона в ростовой среде наблюдается увеличение количества бактерий в среде в логарифмической фазе роста. Величина эффекта стимуляции роста составляет 20–22%. Наибольшее стимулирующее действие на рост бактерий оказывается при начальной концентрации озона 0,35 мг/л, а при начальной концентрации озона 0,57 мг/л и выше наблюдается эффект угнетения роста клеток.

Некоторые авторы считают, что низкие дозы оксиданта, при которых наблюдается митогенный эффект, не могут вызывать оксидативный стресс в общепринятом понимании [43]. Считается, что столь низкие дозы оксиданта являются сигналом для митоза, механизм которого не совсем понятен. Для описания этого явления в литературе используют термин «гормезис» [22–24].

На рис. 3 представлена обобщенная схема ответа делящихся клеток на окис-

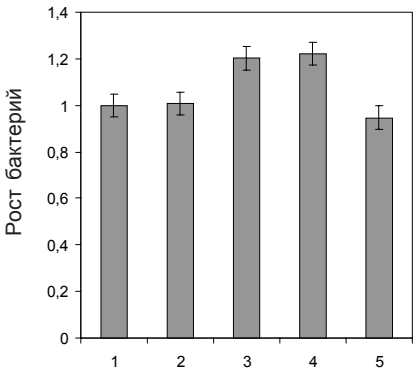


Рис. 2. Показатели роста бактерий *E. coli* в ростовой среде без добавления озона (1, контроль) и при введении в ростовую среду озона в разных начальных концентрациях (мг/л): 2 – 0,0013; 0,013 и 0,062; 3 – 0,12; 4 – 0,35; 5 – 0,57. Данные контроля приняты за 1.

литель – индуктор оксидативного стресса.

Данная зависимость может быть разделена на три области концентраций окислителя. В области низких доз 1 наблюдается стимуляция деления и роста клеток (гормезис). Область средних доз 2 характеризуется обратимой остановкой деления и роста клеток. Деление и рост клеток в этой области возобновляются после прекращения действия окислителя. В области высоких доз окислителя 3 деление и рост клеток не возобновляются, наблюдаются апоптоз и некроз клеток.

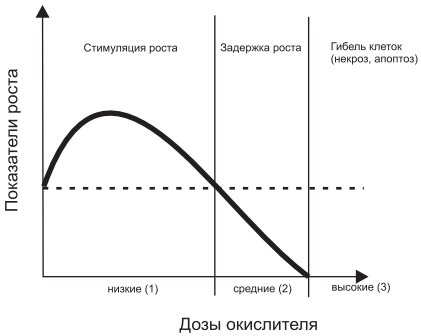


Рис. 3. Обобщенная зависимость показателей роста делящихся клеток от дозы окислителя в ростовой среде.

Представленная на рис. 3 зависимость находится в полном соответствии с предложенной Г. Селье схемой общего адаптационного синдрома стресса [9]. Согласно Г. Селье, синдром стресса проходит три стадии: 1) реакция «тревоги», при которой мобилизуются защитные силы живой системы, чтобы максимально обеспечить условия для спасения от возникшей угрозы. Эта реакция сопровождается мобилизацией энергетических ресурсов для получения дополнительной энергии в условиях напряженной жизнедеятельности; 2) «стадия устойчивости», отражающая адаптацию к стрессорному фактору. На этой стадии общие энергозатраты становятся меньше, чем на первой стадии – живая система частично приспособилась к действию фактора стресса; 3) «стадия истощения», наступающая, если стрессорный фактор сильный и действует длительное время. Резервные энергетические запасы живой системы исчерпываются, и устойчивость ее к внешним воздействиям резко снижается.

Стадии синдрома стресса или характер адаптивного ответа живой системы на действие фактора стресса определяются степенью отклонения параметров гомеостаза за пределы нормальных.

В наших экспериментах это отклонение определяется концентрацией введенного избыточного окислителя (озона).

Наши исследования проводились в области концентраций окислителя 1 и 2, в которых его действие не приводит к гибели клеток (рис. 3).

Устойчивость эритроцитов к осмотическому стрессу при индукции в них оксидативного стресса

Известно, что один из показателей сохранности клеток при криоконсервировании – целостность их мембран. Согласно существующим представлениям наиболее сильным фактором повреждения клеточных мембран при замораживании является осмотический стресс, возникающий под действием гиперконцентрированных растворов при вымораживании основной массы воды [35, 37–39]. Причиной повреждения клеток может также быть постгипертонический шок, возникающий в ходе оттаивания замороженных суспензий клеток [36]. Один из экспериментальных подходов при исследовании осмотического стресса – моделирование условий, возникающих при замораживании биологических систем. В качестве модельного объекта часто используют эритроциты. В таких экспериментах клетки не замораживают, а переносят из одной среды инкубирования в другую с сильно отличающейся осмолярностью и наблюдают за реакцией клеток на резкое изменение осмолярности. При этом направленная модификация клеточных мембран позволяет ослабить действие осмотических факторов повреждения клеток [1].

Мы исследовали действие озона в разных концентрациях на гемолиз эритроцитов в гипертонических условиях в растворах NaCl при температуре 4°C.

На рис. 4 представлены зависимости степени гемолиза эритроцитов от времени выдержки при 4°C в средах с разными концентрациями NaCl и озона.

В контрольных образцах, не содержащих озон, в течение некоторого времени после помещения эритроцитов в среду инкубирования величина гемолиза остается близкой к нулю и со временем нарастает слабо. В средах с 0,15, 0,25 и 0,85 M NaCl это время составляет 3 суток, в средах с концентрацией 0,45 и 1 M NaCl – 2 суток.

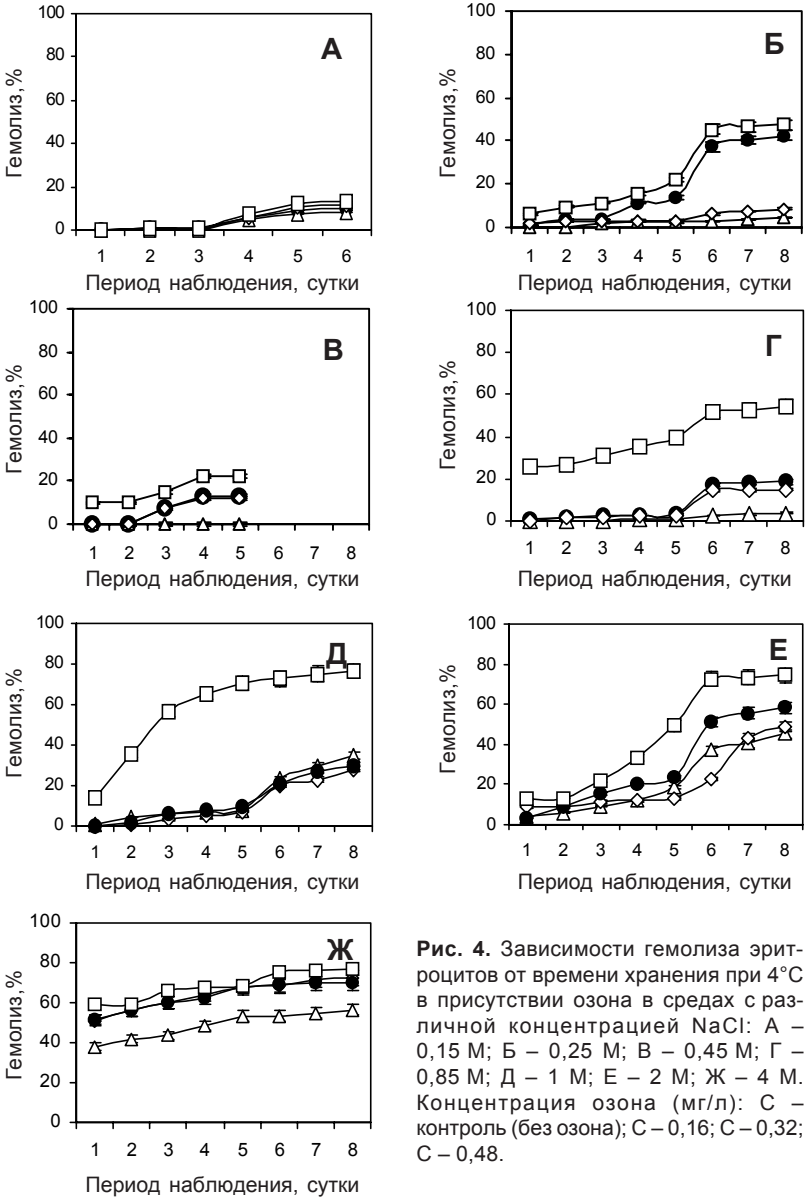


Рис. 4. Зависимости гемолиза эритроцитов от времени хранения при 4°С в присутствии озона в средах с различной концентрацией NaCl: А – 0,15 М; Б – 0,25 М; В – 0,45 М; Г – 0,85 М; Д – 1 М; Е – 2 М; Ж – 4 М. Концентрация озона (мг/л): С – контроль (без озона); С – 0,16; С – 0,32; С – 0,48.

В среде с концентрацией NaCl 2 и 4 М гемолиз эритроцитов наблюдается сразу после помещения клеток в среду инкубирования и составляет в первом случае 5%, а во втором – 40%. Далее в процессе инкубации до 5 суток гемолиз с течением времени увеличивается во всех образцах.

Как видно из рис. 4, действие озона на гемолиз эритроцитов сильно зависит как от концентрации озона, так и от осмолярности среды инкубирования. В средах с концентрацией хлористого натрия 0,15 и 0,25 М концентрации озона 0,16 и 0,32 мг/л вызывают замедление гемолиза, а концентрация озона 0,48 мг/л приводит к увеличению гемолиза, уже начиная с момента помещения клеток в среду инкубирования. В средах с концентрацией NaCl 0,45 и 0,85 М гемолиз еще в большей степени снижается при концентрации озона 0,16 мг/л, однако концентрация озона 0,36 мг/л не приводит к замедлению гемолиза, при этом результаты в пределах погрешности эксперимента совпадают с теми, которые получены для контрольных образцов. Концентрация озона 0,48 мг/л, как и в предыдущих опытах, приводит к сильному увеличению гемолиза.

Таким образом, из представленных результатов видно, что низкие концентрации озона способствуют повышению устойчивости эритроцитов к гипертоническому лизису. Мы объясняем наблюдаемые эффекты результатом перекрестной адаптации клеток в ответ на оксидативный стресс, который приводит к увеличению устойчивости мембран эритроцитов против разрушения в гипертонических условиях.

Действие низких концентраций озона на устойчивость эритроцитов к гемолизу после замораживания-оттаивания

Экспериментальную проверку действия озона на устойчивость эритроцитов к гемолизу в реальных условиях замораживания-оттаивания проводили при криоконсервировании эритроцитов с криоконсервантом «Пропандиосахароль» по методике А.М. Воротилина [3]. Сравнивали динамику гемолиза эритроцитов в следующих условиях: а) без замораживания и добавления озона; б) без замораживания и в присутствии озона; в) после замораживания-оттаивания без добавления озона; г) после замораживания-оттаивания с добавлением озона.

Начальная концентрация озона была выбрана такой, при которой, согласно описанному выше эксперименту, устойчивость эритроцитов к гипертоническому лизису наибольшая – 0,16 мг/л. Озон вводили в суспензию эритроцитов после оттаивания, добавляя озонированный физиологический раствор с концентрацией растворенного озона 10 мг/л в таком количестве, чтобы концентрация озона в получившейся суспензии составила 0,16 мг/л. Результаты исследований приведены на рис. 5.

Как видно из представленных на рис. 5 данных, гемолиз эритроцитов в присутствии озона в концентрации 0,16 мг/л суспензии клеток замедляется как в образцах, не подвергавшихся замораживанию, так и в эритроцитах после замораживания и последующего отогрева.

Действие низких концентраций озона (которые не вызывают апоптоз и некроз клеток) на показатели гемолиза эритроцитов после замораживания-отогрева мы исследовали также, используя криозащитный раствор следующего состава: декстран (м.м. 10000) 20%, ДМСО 5 %, глюкоза 2%, сахароза 7%, NaCl 0,3% [13]. Криозащитную эффективность данного раствора для эритроцитов, как было нами установлено, можно изменять, варьируя содержание декстрана. Используя это свойство криозащитного раствора, мы стремились более четко выделить вклад озона

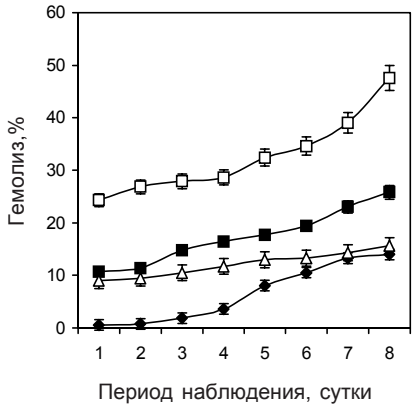


Рис. 5. Зависимость гемолиза эритроцитов от времени инкубации в среде «Пропандиосахароль» при температуре 4°С: 1 – без замораживания и добавления озона; 2 – без замораживания и в присутствии озона в концентрации 0,16 мг/л суспензии клеток; 3 – после замораживания-отогрева без добавления озона; 4 – после замораживания-отогрева с добавлением озона к суспензии в концентрации 0,16 мг/л суспензии клеток.

в изменение показателей гемолиза на фоне защитного действия криопротектора.

Суспензию эритроцитов после отмывания от плазмы разделили на образцы объемом 1 мл, в которые вводили различные криозащитные растворы:

– раствор, приготовленный в соответствии с разработанным ранее протоколом [13];

– растворы, в которых состав всех компонентов и процедура смешивания с эритроцитами соответствовали упомянутому протоколу [13], за исключением декстрана, содержание которого варьировали в пределах 5–30%.

Все образцы замораживали погружением в жидкий азот и отогревали на водяной бане при 36°С. После отогрева эритроциты отмывали от криозащитного раствора физиологическим раствором без озона или содержащим растворенный озон в концентрациях от 0,05 до 0,4 мг/л.

На рис. 6 представлено относительное количество негемолизированных эритроцитов в суспензии после замораживания с криозащитным раствором, оттаивания и отмывания озонированным физиологическим раствором с разной концентрацией озона.

Из рис. 6 видно, что существует оптимальная концентрация озона в отмывочной среде, при которой наблюдается повышение устойчивости эритроцитов к гемолизу после замораживания-

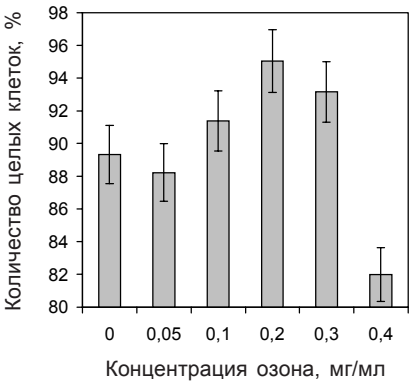


Рис. 6. Количество негемолизированных эритроцитов после замораживания-отогрева с криозащитным раствором [13], и отмывания озонированным физиологическим раствором с разной концентрацией озона.

отогрева. Максимальный эффект достигается после отмывания эритроцитов озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,2 мг/л. В этих условиях количество негемолизированных эритроцитов в суспензии составляет 95,0%. Для контрольного образца, отмытого неозонированным физиологическим раствором, эта величина составляет 89,3%. При концентрациях озона в отмывочном растворе выше или ниже 0,2 мг/л отмечено снижение количества негемолизированных эритроцитов. Данная концентрация достаточно близка к значению 0,16 мг/л, полученному в описанном выше эксперименте по исследованию влияния озона на устойчивость эритроцитов к гипертоническому лизису. Исходя из полученных результатов, для дальнейших исследований действия озона на эритроциты использовали концентрацию озона в отмывочной среде 0,2 мг/л, при которой гемолиз эритроцитов после замораживания-отогрева наименее выражен.

На рис. 7 представлено количество негемолизированных эритроцитов после замораживания-отогрева с криозащитными растворами, защитная эффективность которых была заведомо ниже, чем раствора, приготовленного в соответствии с протоколом [13], поскольку содержание декстрана в них отличалось от оптимального.

Как видно из представленных на рис. 7 данных, отмывание эритроцитов озонированным физиологическим раствором более

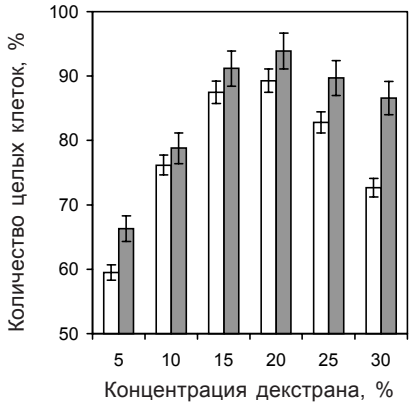


Рис. 7. Количество негемолизированных эритроцитов после замораживания-отогрева при варьировании содержания декстрана в криозащитном растворе [13]. Отмывание образцов после замораживания-отогрева: □ – физиологическим раствором; ▨ – озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,2 мг/л.

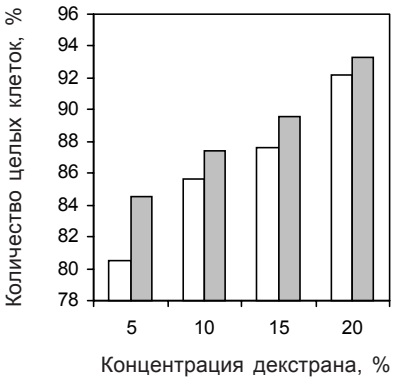


Рис. 8. Количество негемолизированных эритроцитов после экспозиции в криозащитном растворе [9] с различной концентрацией декстрана (без замораживания). Отмывание от криозащитного раствора: □ – физиологическим раствором; ▨ – озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,2 мг/л.

эффективно снижает гемолиз клеток после замораживания-оттаивания в криозащитных растворах с низкой защитной способностью (5 и 30% декстрана). Следует отметить, что в растворе, содержащем 30% декстрана, результаты были не всегда воспроизводимыми после отмывания как неозонированным, так и озонированным физиологическим раствором. По нашему мнению, это связано с повышением вязкости раствора при повышении содержания декстрана, что препятствует однородному перемешиванию клеточной суспензии и криозащитного раствора. В связи с этим в дальнейших исследованиях такую концентрацию декстрана не использовали.

Дополнительно был исследован гемолиз незамороженных эритроцитов, инкубированных в криозащитных растворах с содержанием декстрана 5–20% и отмытых физиологическим раствором, не содержащим озон, либо озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,2 мг/л (рис. 8).

Вид зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации декстрана в криозащитном растворе и характер действия озона такие же, как и при замораживании-отогреве. Относительный эффект озона более выражен в криозащитном растворе, в котором сохранность эритроцитов низкая (раствор, содержащий 5% декстрана). Такая же тенденция видна и на рис. 7 для замороженных-отогретых эритроцитов.

Мы полагаем, что обнаруженный эффект снижения гемолиза эритроцитов при их отмывании после замораживания-отогрева озонированным физиологическим раствором расширяет возможности использования защитных сред с невысокими криозащитными свойствами, но привлекательных, например, их низкой токсичностью.

Исследование действия озона в низких дозах на реабилитацию дрожжей *S. cerevisiae* после криоконсервирования

Дрожжи *S. cerevisiae* широко применяются в промышленности (хлебопекарная отрасль, производство спирта и др.). Криоконсервирование дрожжей важно для сохранения штаммов данного вида. Методы криоконсервирования дрожжей *S. cerevisiae* разрабатывались ранее и изучались возможные пути повышения их сохранности при криоконсервировании путем подбора сред и режимов криоконсервирования [4, 11]. В данной работе мы исследовали возможность использования адаптивного ответа клеток дрожжей на индуцированный озоном оксидативный стресс как способ дополнительного повышения эффективности их криоконсервирования.

Для исследований суспензии клеток дрожжей *S. cerevisiae* в физиологическом растворе с концентрацией клеток 10^6 кл/мл охлаждали в криопробирках («Corning», США) до –196°С погружением в жидкий азот. Образцы оттаивали на водяной бане при 30°С [12].

Жизнеспособность клеток дрожжей после криоконсервирования определяли чашечным методом Коха по количеству макроколоний, образованных на агаризованных средах. Суспензию клеток после замораживания-отогрева разделяли на несколько образцов, в которые вводили озонированный физиологический раствор с концентрацией озона 10 мг/л в таком соотношении, чтобы начальная концентрация введенного озона варьировала в пределах от 0 до 0,75 мг/л. Время от начала отогрева до момента введения озона не превышало 5 мин. Далее образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и высевали на агаризованную среду. После проращивания клеток определяли число колониеобразующих единиц (КОЭ). Полученные результаты представлены на рис. 9.

Как и в описанных выше экспериментах с эритроцитами, действие озона на дрожжи *S. cerevisiae* зависело от концентрации озона.

Показатели колониеобразования дрожжей после инкубации в ростовой среде с концентрацией озона 0,088 мг/л были в 2 раза выше, чем дрожжей в контрольных образцах, не обработанных озоном. При указанной концентрации озона эффект стимуляции колониеобразования был максимальным. С увеличением концентрации озона показатели колониеобразования дрожжей *S. cerevisiae* снижаются, однако при концентрации озона 0,132 мг/л они все еще превышают эти показатели в контрольных образцах. При достижении концентрации озона 0,75 мг/л показатели колониеобразования снижаются в 3 раза по сравнению с контролем. Более высокие концентрации озона (на рис. 9 не показаны) вызывают резкое снижение показателей колониеобразования, вплоть до полного прекращения деления и роста клеток. Мы связываем наблюдаемые эффекты с вызванной оксидативным стрессом перекрестной адаптацией клеток к факторам действия низких температур.

Согласно существующим представлениям первая ступень клеточного ответа на оксидативный стресс – активизация антиоксидантной защиты, направленная на репарацию системы для минимизации возникающих повреждений, а также на устранение

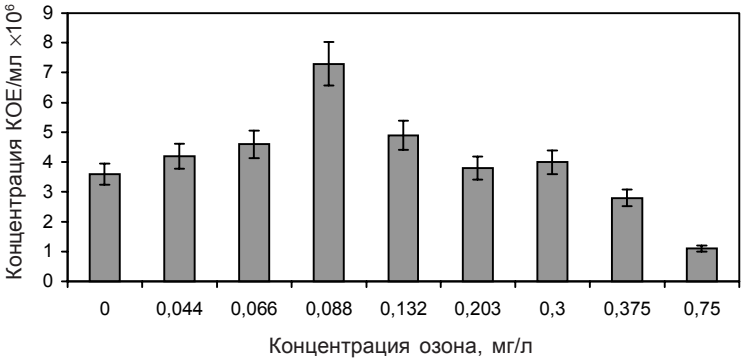


Рис. 9. Показатели колониеобразования криоконсервированных дрожжей *S. cerevisiae* после замораживания-отогрева, инкубированных в ростовой среде с различной концентрацией озона.

поврежденных клеточных компонентов [14–18, 22–24, 43, 45]. Можно полагать, что реакции перекрестной адаптации при оксидативном стрессе имеют сходный характер: в клетке включаются механизмы репарации повреждений, возникших в результате причин, не связанных с оксидативным стрессом – например нелетальные криоповреждения, возникшие на этапах замораживания и отогрева клеток. По нашему мнению, обнаруженное повышение жизнеспособности криоконсервированных клеток при добавлении озона в ростовую среду после оттаивания может быть объяснено репарацией нелетальных криоповреждений, эффективность которой возрастает в результате вызванной оксидативным стрессом перекрестной адаптации.

Обработка клеток индуктором оксидативного стресса перед замораживанием

Описанные выше эксперименты по реабилитации клеток после замораживания-отогрева были выполнены при концентрациях озона, которые согласно принятой нами классификации (см. рис. 3) соответствуют области низких доз оксиданта. Представляет интерес использовать в криобиологии эффекты, которые вызваны индуктором оксидативного стресса в клетках при концентрациях, обозначенных на рис. 3 как средние. Действие средних концентраций оксиданта, в отличие от низких, приводит к временной остановке деления и роста клеток. В исследованиях на человеческих фибробластах [14–18, 45] этот эффект наблюдали при дозах перекиси водорода от 2 до 5 мкмоль/10^7 клеток. Остановка роста может длиться 2–4 часа и возникает в результате экспрессии генов *gadd45*, *gadd153* [14, 28, 29] и *adapt15* [16–18]. Многие исследователи рассматривают временную остановку роста как механизм защиты от токсического действия оксиданта [16–18, 45]. Нами была предпринята попытка обнаружить перекрестную адаптацию клеток к факторам криоконсервирования при индукции в них адаптивного ответа на средние дозы оксиданта.

Для исследований нами были выбраны дрожжеподобные грибы *Candida albicans*. Поскольку в качестве суспензионной среды в экспериментах по замораживанию микроорганизмов мы использовали физиологический раствор, вначале было исследовано

влияние озона в разных дозах на жизнеспособность клеток в физиологическом растворе до замораживания. К суспензиям микробов в физиологическом растворе добавляли озонированный физраствор для достижения концентрации озона в получившейся суспензии 0,16–0,8 мг/л. Суспензии выдерживали при комнатной температуре и через каждые 30 мин высевали на агаризованную среду для определения количества жизнеспособных клеток в образцах по описанной выше методике (табл. 1).

Установлено, что в течение 60 мин озон не имел достоверного повреждающего действия, вызывающего гибель клеток. Через 2 ч количество жизнеспособных клеток достоверно снижалось. Все последующие эксперименты проводили так, чтобы время с момента добавления озона в консервирующую среду до замораживания не превышало 30 мин.

В последующей серии экспериментов мы изучали жизнеспособность микроорганизмов, замороженных в физиологическом растворе, в который перед замораживанием клеток добавляли различное количество озонированного физиологического раствора.

Таблица 1. Жизнеспособность дрожжеподобных грибов *C. albicans* после инкубации в течение 1 и 2 ч в физиологическом растворе с добавлением озона в различных дозах без замораживания

Время инкубации, мин	Процент жизнеспособных клеток в средах с озоном в различных концентрациях (мг/л) без замораживания					
	Контроль (среда без озона)	0,16	0,32	0,48	0,64	0,8
60	92,4 ± 5,0	93,2 ± 6,1	91,9 ± 4,5	92,4 ± 5,5	93,7 ± 4,9	91,2 ± 5,0
120	92,4 ± 5,0	92,1 ± 4,5	87,3 ± 4,4	62,7 ± 4,9*	58,3 ± 4,1*	45,6 ± 4,0*

Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Суспензии клеток в физиологическом растворе замораживали по двум программам: 1 – со скоростью охлаждения 2 град/мин от 18 до –70°С (на программном замораживателе «Cryoson SV» Германия) с последующим погружением в жидкий азот; 2 – погружение образцов в жидкий азот.

После замораживания образцы извлекали из жидкого азота и отогревали на водяной бане при 37°С. В образцы, подвергавшиеся замораживанию согласно одно- или двухступенчатому режиму, через 10 мин после начала отогрева добавляли озонированный раствор до концентрации озона 0,16–0,48 мг/л в ростовой среде таким же способом, как описано выше в эксперименте с *S. cerevisiae*. Образцы инкубировали в растворе, содержащем озон, в течение 10 мин, далее проводили посев на чашки Петри. Каждый образец высевали на 6 чашек Петри и инкубировали в течение суток при температуре 30°С. После этого подсчитывали количество колоний на чашках и сравнивали числа КОЭ исследуемого и контрольного (не содержащего озон) образцов.

Результаты исследования дрожжеподобных грибов *C. albicans* после замораживания-отогрева в этих условиях представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, действие озона неодинаково для клеток, замороженных по разным режимам. При замораживании грибов согласно одноступенчатому режиму наблюдалась более высокая их выживаемость в присутствии озона в концентрации 0,16–0,64 мг/л. При повышении концентрации озона до 0,8 мг/л жизнеспособность достоверно не отличалась от контроля. В образцах, замороженных по двухступенчатому режиму, более высокая жизнеспособность наблюдалась при концентрации озона 0,16–0,32 мг/л. При концентрации озона 0,48 мг/л жизнеспособность клеток *C. albicans*, замороженных с использованием двухступенчатого режима достоверно не отличалась от контрольных значений, а повышение концентрации озона до 0,64–0,8 мг/л снижало жизнеспособность грибов относительно контрольных образцов.

Следовательно, действие озона, введенного в суспензию клеток перед их замораживанием в дозах, превышающих некоторое граничное значение, оказывается деструктивным – клетки испытывают дополнительное повреждение на фоне криоповреждений.

Таблица 2. Жизнеспособность дрожжеподобных грибов *C. albicans* после замораживания-отогрева в растворах, содержащих озон (озон добавляли в ростовую среду перед замораживанием)

Режим замораживания	Процент жизнеспособных клеток после замораживания-отогрева в средах с добавленным перед замораживанием озоном в различных концентрациях, мг/л					
	Контроль (среда без озона)	0,16	0,32	0,48	0,64	0,8
Одноступенчатый	47,8 ± 2,9	61,7 ± 2,9*	66,9 ± 4,2*	65,5 ± 4,7*	61,2 ± 3,1*	42,5 ± 5,7
Двухступенчатый	35,3 ± 3,1	56,7 ± 3,4*	50,2 ± 5,0*	33,9 ± 3,5	15,1 ± 1,2*	3,4 ± 0,8*

Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Использование менее эффективного для данных клеток двухступенчатого режима замораживания снижает это граничное значение. Повышение жизнеспособности клеток при введении в них озона перед замораживанием может быть получено только в определенном диапазоне доз озона, подобранном для конкретных условий замораживания-отогрева. Похожая закономерность проявляется и при введении озона в суспензию клеток после замораживания – существует диапазон концентраций, при которых эффект озона проявляется максимально (рис. 9).

Сравнивая приведенные в табл. 2 значения концентраций озона, при которых эффект озона максимален при введении перед замораживанием, с представленными на рис. 9 значениями, при которых наблюдается подобный эффект в ответ на введение озона в ростовую среду клеток *S. cerevisiae* после замораживания-отогрева, можно определить, что во втором случае значения концентраций существенно (примерно в 5 раз) ниже, чем в первом.

Отсюда следует, что механизм действия озона в обоих случаях не одинаков. При низких концентрациях озона проявляется мито-

генный эффект раздражителя (гормезис) [43]. Например, А.М. Мельникова с соавт. [6] показали, что под действием озона в низких дозах происходит активация деления клеток *C. utilis*, существенно снижается ростовая фаза адаптации культуры, а также регистрируется стимуляция эндогенного дыхания, что связывают с реорганизацией структуры клеточных мембран. Можно предполагать, что подобное действие озон в низких дозах оказывает и на клетки *S. cerevisiae*.

Однако трудно установить четкую границу между дозами окислителя, вызывающими явление гормезиса или оксидативный стресс в общепринятом понимании и нельзя исключить обычную реакцию исследуемых клеток *S. cerevisiae* на оксидативный стресс при низких дозах озона. Как упоминалось выше, живая система, подвергающаяся действию одного стрессорного фактора, приобретает способность к устойчивости против других негативных воздействий (перекрестная адаптация). Адаптивный потенциал проявляется как сумма возможностей приспособления, заложенная в геноме организма. В этом отношении типичными примерами может быть взаимосвязь между дефицитом воды и повышением устойчивости к понижению температуры у цитрусовых [47, 48], ржи [44], пшеницы [46], кизила [19]. Водный дефицит снижает чувствительность растений фасоли к последующей обработке озоном [15, 33]. Установлено, что кратковременное воздействие повышенной температуры (45°C) на растения бобов стимулирует у них способность к выживанию при более высокой температуре (55°C), при которой контрольные растения погибают [41, 49–51].

Мы полагаем, чти аналогично проявляется адаптивный ответ замороженных-отогретых клеток *S. cerevisiae* и эритроцитов на стресс под влиянием озона в низких дозах: изменяется физиологическое состояние клетки, индуцируются стресс-факторы, изменяющие метаболизм клетки, что приводит к развитию перекрестной адаптации и репарации повреждений, возникших под действием другого стресссорного воздействия – замораживания-отогрева.

Реакция клеток на оксидативный стресс при средних дозах озона в экспериментах с клетками *C. albicans* иная. Окислитель в средних дозах вызывает обратимую остановку деления и роста клеток и в таком состоянии они менее чувствительны к различным

внешним воздействиям [43]. Следовательно, вызванный озоном в средних дозах оксидативный стресс перед замораживанием клеток приводит их в состояние, «подготовленное» к действию факторов криоконсервирования.

Таким образом, на примере эритроцитов человека, дрожжей *S. cerevisiae* и дрожжеподобных грибов *C. albicans* экспериментально установлено следующее: оксидативный стресс, вызванный в клетках перед замораживанием или после замораживания-отогрева, может повышать эффективность криоконсервирования клеток. Обнаруженные эффекты зависят от дозы индуктора оксидативного стресса и объясняются вызванной оксидативным стрессом перекрестной адаптацией клеток к факторам действия низких температур.

Авторы выражают благодарность к.б.н., с.н.с. Высеканцеву И.П. за консультацию и помощь при проведении экспериментов с микроорганизмами.

Литература

1. Белых И.А. Влияние озонированных сред инкубирования и культивирования на кинетику роста и отмирания периодической культуры Escherichia coli // Актуальные проблемы медицины и биологии.– 2004. – №1. – С. 397–402.
2. Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С. Стресс растения. Биофизический подход // Физиология растений. – 1993.– Т. 40, №4.– С. 553–557.
3. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Дис. ... д-ра. биол. наук. – Харьков, 1987. – 250 с.
4. Кудокоцева О.В. Влияние физико-химических факторов низкотемпературного консервирования на расы дрожжей: Дис. ...канд. биол. наук. – Харьков, 1986. – 171 с.
5. Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона.– М.: Изд-во МГУ, 1998. – 480 с.
6. Мельникова А.М., Матус В.К., Калер Г.В. и др. Озон-индуцированная модификация структурно–физического состояния плазматических мембран дрожжей C. utilis // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 1998. – Т. 42, №1. – С. 88–92.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.– М.: Мир, 1976.– 438 с.
8. Похиленко В.Д., Иткин Ю.А. Действие глубокого замораживания на Bacillus thuringiensis // Криобиология и криомедицина. –1980. – Вып. 6. – С. 57–59.
9. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М.: Медгиз, 1960.– 255 с.
10. Филиппов Ю.В., Вобликова В.А., Пантелеев В.И. Электросинтез озона. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2008. – 237 с.
11. Цуцаева А.А., Попов В.Г. Сытник К.М. Криобиология и биотехнология. – К.: Наук. думка, 1987. – 216 с.

12. Пат. 8660, Україна МПК7 С12 №1/38. Спосіб підвищення проліферативної активності мікроорганізмів / В.І. Грищенко, І.П. Висеканцев, В.Д. Зінченко та інш.; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №200500928; заявл. 02.02.2005; опубл. 15.08.2005, Бюл. №8.
13. Пат. №18571. Україна, МПК7 A01N1/02. Спосіб кріоконсервування еритроцитів / Є.Л. Воловельська, І.А. Мусіна, В.Д. Зінченко та інш.; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №2006051129; заявл. 10.05.2006; опубл. 15.11.2006, Бюл. №11.
14. Bartlett J.D., Luethy J.D., Carlson S.G. et al. Calcium ionophore A23187 induces expression of the growth arrest and DNA damage inducible CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, gadd153. Ca^{2+} increases transcriptional activity and mRNA stability // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267, №28. – P. 20465–20470.
15. Bender J., Tingey T., Jager H. et al. Physiological and biochemical responses of bush bean to ozone and drought stress // J. Plant Physiol. – 1991. – Vol. 137, №2. – P. 565–570.
16. Burdon R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation // Free Radic. Biol. Med. – 1995. – Vol. 18, №4. – P. 775–794.
17. Burdon R.H., Rice-Evans C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation // Free Radic. Res. Commun. – 1989. – Vol. 6, №6. – P. 345–358.
18. Chance B., Sies H. and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiol. Rev.– 1979. – Vol. 59, №3. – P. 527–605.
19. Chen P., Li P., Burke M. Induction of frost hardiness in stem cortial tissues of Cornus stoloniferal Michx by water stress // Plant Physiol. – 1977 – Vol. 59, №1.– P. 236–239.
20. Cortes F., Dominiquez I., Pinero J., Mateos J.C. Adaptive responces in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide before irradiation with X-rays // Mutagenesis. – 1990. – Vol. 5, №6 – P. 555–557.
21. Christman M.F., Morgan R.W., Jacobson F.S., Ames B.N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in Salmonella typhimurium // Cell. – 1985. – Vol. 41, №3.– P. 753–762.
22. Crawford D. R., Davies K. J. Adaptive response and oxidative stress // Environ Health Perspect. – 1994. – Vol.102, Suppl. 10. – P. 25–28.
23. Crawford D. R., Schools G. P., Davies K. J. Oxidant-inducible adapt 15 RNA is associated with growth arrest and DNA damage–inducible gadd153 and gadd45 // Arch. Biochem. Biophys. – 1996. – Vol.329, №2. – P. 137–144.
24. Crawford D.R., Schools G.P., Salmon S.L., Davies K.J. Hydrogen peroxide induces the expression of adapt15, a novel RNA associated with polysomes in hamster HA-1 cells // Arch. Biochem. Biophys. – 1996. – Vol. 325, №2. – P. 256–264.
25. Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // Cell Mol. Life Sci. – 2000. – Vol. 57, №4. – P. 779–795.
26. Davies J. M., Lowry C. V. and Davies K. J. Transient adaptation to oxidative stress in yeast // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 317, №1. – P. 1–6.
27. Demple B. and Halbrook J. Inducible repair of oxidative DNA damage in Escherichia coli // Nature. – 1983. – Vol. 304, №5925. – P. 466–468.
28. Fornace, AJ. Jr., Jackman J. at al. Genotoxic–stress–response genes and growth–arrest genes gadd, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 663, №21. – P. 139–153.
29. Fornace A.J. Jr., Nebert D.W., Hollander M.C. et al. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents // Mol.Cell Biol. – 1989. – Vol. 9, №10. – P. 4196–4203.
30. Frohnmeyer H., Staiger D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants, balancing damage and protection // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 133, №4. – P. 1420–1428.
31. Fregly M.J. Adaptations: some general characteristics // Environmental Physiology / Ed. by M.J. Fregly. – New York: Oxford University Press, 1996. – P. 3–15.
32. Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics // Science. – 2009. – Vol. 325, №5946. – P. 1380–1384.

33. Langebartels C., Kerner K., Leonard S. et al. Biochemical responses to ozone // Plant Physiol. – 1991. – Vol. 95, №3. – P. 882–889.
34. Lunt H.C., Barwood M.J., Corbett J., Tipton M.J. Cross-adaptation: habituation to short repeated cold-water immersions affects the response to acute hypoxia in humans // J. Physiol. – 2010. – Vol. 588, №18. – P. 3605–3613.
35. Luyet B.J. On the possible biological significance of some physical changes encountered in the cooling and rewarming of aqueous solution // Cellular injury and resistance freeze organisms: Bulletin. – 1967.– Vol. 2. – P. 1–22.
36. McGann L.E., Farrant J. Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to (–196)°C. II. Warming rate and concentration of dimethyl sulfoxide // Cryobiology. – 1976. – Vol. 13, №3. – P. 269–273.
37. Meryman H.T. The relationship beetween dehydration and freezing injury in the human erythrocyte // Cellular injury and resistance in freezing organisms: Bulletin.– 1967. – Vol. 2. – P. 231–244.
38. Meryman H.T. Osmotic stress as an mechanism of freezing injury // Cryobiology. – 1971. – Vol. 8, №5. – P. 489–500.
39. Mironescu S. Hyperosmotic injury in mammalian cells. I. Survival of CHO cells in unprotected and DMSO treated cultures // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, №4. – P. 451–465.
40. Mujahid A., Akiba Y., M. Toyomizu. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein // Poultry Science. – 2007. – Vol. 86, №2. – P. 364–371.
41. Palta J. P. Stress interactions at the cellular and membrane levels // Hort. Science. – 1990.– Vol. 25, №11. – P.1377–1381.
42. Pastori G.M., Foyer C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of «Redox» and abscisic acid-mediated controls // Plant. Physiol.– 2002. – Vol. 29, №2. – P. 460–468.
43. Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol. 291, №3. – P. 491–511.
44. Siminovitch, D., Cloutier Y. Twenty-four hour induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by dessicstin stress at room temperature in the dark // Plant Physiol. – 1982. – Vol. 69, №1. – P. 250–255.
45. Wiese A.G., Pacifici R.E., Davies K.J. A transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 318, №1. – P. 231–240.
46. Willemot, C., Pelletier L., Effect of drought on frost resistance and fatty acid content of young winter wheat plants // Can. J. Plant Sci. – 1979. – Vol. 59, №3.– P. 639–643.
47. Yelenovsky G. Water stress induced cold hardening of young citrus trees // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1979. – Vol. 104, №1. – P. 270–273.
48. Yelenovsky G. Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regimes // Plant Physiol. – 1979. – Vol. 64, №2. – P. 425–427.
49. Yordanov I. Response of photosynthetic apparatus to temperature stress and molecular mechanisms of its adaptation // Photosynthetica. – 1992. – Vol. 26, №4. – P. 517–531.
50. Yordanov I., Goltsev V., Stoyanova T., Venediktov P. High-temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus // Planta. – 1987. – Vol. 170, №2 – P. 471–477.
51. Yordanov I., Dilova S., Petkova R. et al. Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the phitosynthetic apparatus // Photobiochem. Photobiol. – 1986. – Vol. 12, №1. – P. 147–155.

2. Криоконсервирование и гипотермическое хранение клеток, тканей и изолированных органов

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины

Криоконсервирование стволовых/прогениторных клеток фетальных тканей

А.Ю. Петренко*, Ю.А. Петренко, А.Н. Сукач, Н.А. Волкова, Н.Г. Скоробогатова, А.И. Тарасов, Н.А. Труфанова, С.П. Мазур

Отдел криобиохимии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: alexander_petrenko@cryo.org.ua*

Конец XX – начало XXI века ознаменовались рядом крупнейших достижений биологии стволовых клеток (СК) – недифференцированных клеток, способных к самообновлению и образованию различных клеточных типов. В настоящее время эти клетки являются объектом многочисленных исследований в области биологии развития, клеточной биологии, генной и тканевой инженерии, селекции, в экспериментальной и клинической медицине. Их применение открывает перспективы для создания принципиально новых эффективных биомедицинских технологий, позволяющих решать проблемы лечения ряда тяжелейших заболеваний человека.

Содержание и дифференцировочный потенциал СК в организме снижаются в онтогенезе. Относительное количество стволовых клеток в фетальных тканях, особенно в первом триместре внутриутробного развития, во много раз выше, чем в органах и тканях взрослого организма [31], причем их пул представлен в основном мультипотентными региональными СК, которые обычно дифференцируются в клетки того региона (органа, ткани), в котором они находятся.

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 295–336.
© А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, А.Н. Сукач и др., 2012

Используемые сокращения
ДМСО – диметилсульфоксид
КОЕ – колониеобразующая единица
КП – клетки-предшественники
МСК – мезенхимальные стромальные клетки
НК – нейральные клетки
1,2-ПД – 1,2-пропандиол
ПЭО – полиэтиленоксид
СК – стволовые клетки
ТС – трипановый синий
ФК – фибробластоподобные клетки
ФПЧ – фетальная печень человека
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭГ – этиленгликоль
ЭС – эмбриональная сыворотка

Особенностью фетальных тканей, помимо высокого содержания СК, является слабая представленность в их общем клеточном пуле зрелых окончательно дифференцированных клеток. В абсолютном большинстве клетки фетальных тканей – это быстро пролиферирующие прогениторные клетки разных уровней коммитации.

Свойства фетальных тканей определяют особый интерес к ним как к источнику стволовых/прогениторных клеток различного гистогенетического происхождения, а также обусловливают необходимость усовершенствования традиционных и разработки новых методов криоконсервирования клеточных суспензий, полученных из фетальных тканей, основной целью которых следует считать сохранение уникальных свойств СК и клеток-предшественников (КП).

В данном разделе рассматриваются известные и перспективные подходы к криоконсервированию суспензий клеток фетальных тканей, являющихся производными трех зародышевых листков – энтодермы, эктодермы и мезодермы.

Традиционный взгляд на фетальную печень человека (ФПЧ), основной кроветворный орган в период 4–25 недель внутриутробного развития плода, как на источник преимущественно гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток в настоящее время существенно расширился в связи с углублением знаний о свойствах, потенциале и взаимовлияниях других клеточных типов, участвующих в формировании этого органа.

В первом триместре пренатального развития ФПЧ образуется из клеток – производных различных зародышевых листков и содержит гемопоэтические, гепатические, мезенхимальные и другие клетки различной степени коммитированности [31, 20]. Определение клеточного состава ФПЧ, свойств и соотношения клеточных

элементов различных фенотипов, уровня их дифференцированности, а также устойчивости к действию различных экзогенных и эндогенных факторов является существенной задачей при оценке потенциала ФПЧ как источника СК и КП, а также служит базой для научно обоснованной разработки методов и подходов к криоконсервированию клеток фетальной печени.

Известно, что в первом триместре гестации печень человека состоит преимущественно из кроветворных клеток – производных мезодермы и гепатических клеток (печеночный эпителий) – производных энтодермы; паренхима ФПЧ пронизана синусоидальной сетью эндотелия [1]. При этом морфологические исследования клеточного состава наиболее многочисленной популяции ФПЧ – гемопоэтического ростка – выявляют в нем совокупность представителей эритроидной, лимфоидной, гранулоцитарной и мегакариоцитарной линий кроветворения [2].

Проведенные в последние годы в отделе криобиохимии ИПКиК НАН Украины гистологические и ультраструктурные исследования ФПЧ 8–10 недель гестации показали высокую гетерогенность ее клеточного состава (рис. 1) и позволили установить соотношение основных морфологически различимых клеточных типов.

Более 80% всей клеточной популяции ФПЧ составляли гемопоэтические эритроидные клетки (эритробласты, проэритробласты и ретикулоциты), причем 49,8 ± 6,4% из них определялись как базофильные, орто- и полихроматофильные эритробласты, мало отличимые друг от друга. Ранние эритроидные предшественники проэритробласты составляли 10,5 ± 1,7%, а более коммитированные ретикулоциты – 21,7 ± 5,2% от общего числа клеток. Клеток печеночного эпителия на данном этапе развития печени определялось

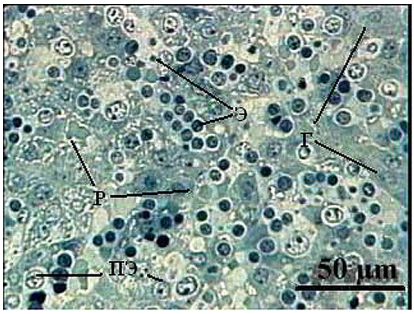


Рис.1. Полутонкий срез фетальной печени человека 8 недель гестации: Э – эритробласты различной степени зрелости; ПЭ – проэритробласты; Г – гепатобласты; Р – ретикулоциты. Окраска толуидиновым синим.

всего 18 ± 4,7%. Помимо клеток гемопоэтического и гепатического ростков, выявлялись клетки эндотелия синусоидальных капилляров, а также единичные фибробластоподобные клетки.

Топографически эритробласты наблюдались как внутри, так и вне синусоидальной сети печени, в виде островков среди гепатических клеток (рис. 2) либо иногда в виде групп вокруг центрального макрофага.

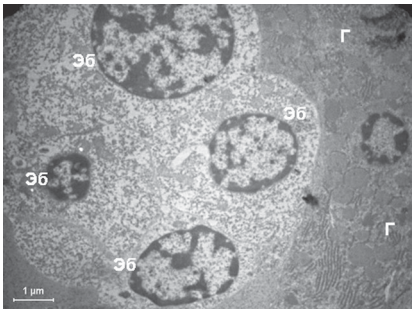


Рис. 2. Локализация эритробластов в ФПЧ: островок базофильных эритробластов (Эб) среди гепатобластов (Г).

Лимфоцитоподобные клетки, к которым, в соответствии с морфологическими признаками, могут быть отнесены клетки лимфоидного ростка, а также стволовые кроветворные клетки и ранние клетки-предшественники [27], при световой и электронной микроскопии препаратов ФПЧ 8–10 недель пренатального развития обнаруживались редко. Это обстоятельство, вероятно, обусловлено как низким содержанием лимфоцитоподобных клеток в этот период гестации, так и возможностями метода исследования.

Гепатические клетки (печеночный эпителий) представляют вторую по величине популяцию в ФПЧ. Все гепатические клетки происходят из одного самого раннего предшественника – энтодермальной стволовой клетки, способной давать начало как клеткам гепатического ростка, так и клеткам поджелудочной железы и кишечника. Ближайшими потомками энтодермальной стволовой клетки являются гепатобласты, способные дифференцироваться в гепатоциты или холангиоциты, что было установлено по совместной экспрессии маркеров данных ростков и восстановлению их клеточных популяций после экспериментальной трансплантации.

В наших наблюдениях морфологически идентифицируемые клетки печеночного эпителия в ФПЧ 8–10 недель внутриутробного развития были представлены в основном гепатобластами. Они

располагались в виде эпителиальных тяжей и групп из 3–4 клеток, окруженных формирующимися синусоидальными капиллярами. Поляризация строения клеток, свойственная дифференцированным гепатоцитам, еще не была выражена, наблюдались клетки полигональной и неправильной многоугольной формы, имеющие округлое или овальное ядро с диффузно рассеянным хроматином и 1–2 ядрышками глобулярно-фибриллярной природы. В ряде случаев отмечены десмосомоподобные контакты между эритробластами и гепатобластами, что может указывать на возможное участие последних в развитии гемопоэтических клеток.

Более детально гепатические клетки были охарактеризованы при монослойном культивировании *in vitro* клеточной суспензии, полученной после дезагрегации печени. Через 48–72 ч после посева в культуре выявлялись клетки эпителиальной морфологии – представители печеночного ростка, которые в процессе культивирования к 5-м суткам образовывали плотные центры и очаги роста (рис. 3). На периферии зон роста присутствовали фибробластоподобные, а также овальные и многоугольные клетки с множеством отростков, возможно, макрофагальной природы.

Иммуноцитохимические исследования экспрессии культивированными клетками печеночных маркеров α-фетопротеина и альбумина проводили на 4-е и 10-е сутки культивирования. Было установлено, что через 4 суток культивирования большинство эпителиоподобных клеток в культуре позитивно окрашивались моноклональными антителами на α-фетопротеин, при этом экспрессия альбумина в клетках практически не выявлялась. Через 10 суток монослойного культивирования наблюдалась противоположная картина. Эти результаты свидетельствуют о возможном созревании гепатических клеток

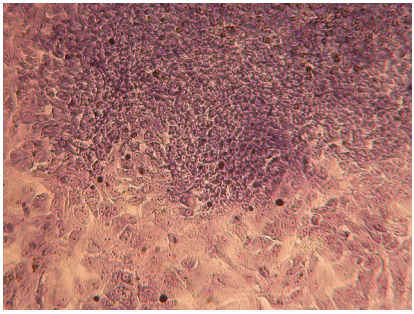


Рис. 3. Монослойная культура первичной суспензии клеток ФПЧ на 5-е сутки культивирования. Окраска по Романовскому, ×40.

в процессе монослойного культивирования, что сопровождается повышением экспрессии альбумина – маркера зрелых гепатических клеток.

Эндотелиальные клетки, или эндотелиоциты, выстилают синусоидальные капилляры ФПЧ исследуемого срока гестации, составляя незначительную в количественном отношении часть клеточной популяции. Они представляют собой уплощенные клетки с большими порами и фенестрами в периферических отростках.

Эндотелиальные клетки оказывают существенное влияние на процесс кроветворения в эмбриональной печени, поскольку секретируют IL-1, фактор некроза опухоли α (TNF-α), колониестимулирующий фактор гранулоцитов, макрофагов (GM-CSF) [38], а также обеспечивают секрецию ростовых факторов и цитокинов (SCF, IL-6, IL-9, EPO и др.), участвующих в регуляции пролиферации и дифференцировки кроветворных СК и КП.

Для идентификации эндотелиальных предшественников в первичной суспензии клеток ФПЧ первого триместра гестации мы провели иммуноцитохимическое определение экспрессии Flk-1 (fetal liver kinase-1) – специфичного и наиболее раннего маркера эндотелиальных КП, который является рецептором фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), отвечающего за пролиферацию и дифференцировку [49]. С этой же целью использовали функциональный метод оценки способности клеток к капиллярообразованию *in vitro* во внеклеточном матриксе.

Было установлено,что клетки ФПЧ при культивировании в матриксе «Матригель» не только прикреплялись друг к другу, образуя сфероиды, но и формировали отростчатые структуры различной толщины и протяженности, способные связывать в некоторых случаях близлежащие клеточные агрегаты (рис. 4).

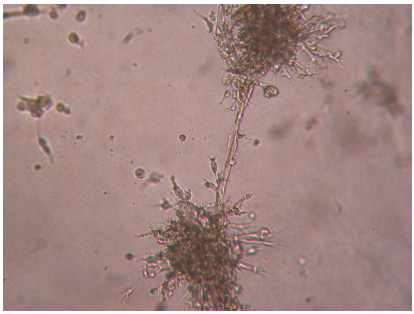


Рис. 4. Формирование капилляроподобных структур клетками ФПЧ после 24 ч культивирования во внеклеточном матриксе «Матригель». Прижизненное наблюдение, ×100

Выявленная морфологическая картина позволила определить образовавшиеся структуры как капилляроподобные, полученные *in vitro* и описанные ранее в ряде работ [13, 33]. Проведенные параллельно иммуноцитохимические исследования показали, что часть клеток суспензии ФПЧ позитивно окрашивалась на Flk-1, это свидетельствовало об их принадлежности к эндотелиальным клеткам-предшественникам.

Наряду с гемопоэтическими, гепатическими и эндотелиальными клетками в составе ФПЧ первого триместра гестации присутствуют СК и КП мезенхимального ростка, играющие важнейшую роль как в поддержании кроветворения, так и в развитии гепатических клеток [31]. Общее количество мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в ФПЧ первого триместра гестации незначительно и составляет около 0,002% всех ядросодержащих клеток [3], поэтому для их идентификации требуются специальные методы выделения и селективного культивирования.

МСК, полученные из ФПЧ и других фетальных тканей, имеют сходные характеристики: морфологически это веретенообразные адгезивные клетки, способные к дифференцировке в остео-, адипо- и хондрогенном направлениях. Они не экспрессируют гемопоэтические или эндотелиальные маркеры, однако способны к экспрессии ассоциированных стромальных маркеров. Важно, что МСК ФПЧ первого триместра гестации экспрессируют маркеры плюрипотентных стволовых клеток, такие как Oct-4, Nanog, Rex-1 и др. [20], это расширяет перспективы применения таких стромальных клеток в практических целях.

Таким образом, в формировании структуры ФПЧ 8–10 недель гестации участвуют несколько типов КП, различающихся как гистогенетически, так и по степени дифференцировки. Проведенные исследования подтверждают их присутствие в первичной суспензии ФПЧ, полученной механическим способом[35], которая и является объектом криоконсервирования. Традиционно криоконсервирование клеток ФПЧ проводится по протоколам, разработанным для гемопоэтических клеток периферической крови и костного мозга, основная масса которых представлена коммитированными эритроидными клетками. Целесообразность этого подхода очевидна с точки зрения сохранности основного клеточного пула ФПЧ, гемопоэтических эритроидных клеток, но далеко не так обоснована

для сохранения наиболее интересных популяций ФПЧ – СК и КП различного гистогенеза. Как уже отмечалось, морфологические методы не позволяют идентифицировать ранние клетки-предшественники в составе первичных суспензий фетальных тканей, равно как и оценить их сохранность после криовоздействия. Для этого требуется привлечение более специфических, точных методов идентификации клеточных элементов – иммунофенотипического анализа и определения колониеобразующей способности клеток.

Стволовые кроветворные клетки могут быть достаточно точно идентифицированы на основе своих специфических иммунофенотипических характеристик. Уже более двух десятилетий наиболее распространенным маркером кроветворных СК и КП является CD34-антиген, экспрессия которого на их мембранах впервые была показана в работе C.I. Civin *et al.* [14], но до сих пор функциональное назначение молекулы CD34 в системе кроветворения не выяснено. Существуют данные, что этот гликопротеин участвует в процессах клеточной адгезии и хоминга [22]. Маркером наиболее примитивных гемопоэтических клеток ФПЧ также считают CD133 (AC133), селективно экспрессирующийся на поверхности CD34-позитивных клеток [18]. M.O. Muench *et al.* [30] показали обратную корреляцию между экспрессией CD38-антигена $CD34^+$-клетками и степенью их коммитированности. Рецептор фактора стволовых клеток c-kit (CD117) экспрессируют более 70% кроветворных КП, в то же время кроветворные СК и КП обладают менее выраженной экспрессией данного маркера [9]. Схожая картина наблюдается в экспрессии HLA-DR кроветворными клетками – имеется прямая корреляция между экспрессией данного маркера на поверхности клеток и их линейной коммитацией [37].

Для коммитированных эритроидных предшественников разной степени зрелости, а также эритроцитов характерен гликофорин А (Gly-A). CD45 экспрессируется на коммитированных лимфоидных предшественниках, всех зрелых лейкоцитах, а также на кроветворных КП. К линейноспецифическим относят лимфоидные (CD10, CD124, CD127), Т-лимфоидные (CD2, CD5, CD7, CD8), В-лимфоидные (CD19, CD24, CD72), миелоидные (CD33, CD131), эритроидные (CD36, CD41, CD71), грануломоноцитарные (CD13, CD15, CD84, CD115, CD116), гранулоцитарные (CD86, CD88), мегакариоцитарные (CD61) и другие маркеры.

Претенденты на роль кроветворных СК и КП в составе первичной суспензии ФПЧ 6–12 недель гестации нами выявлялись на основании экспрессии CD34, CD38, CD133, CD45 и Gly-A. Методом проточной цитометрии было показано абсолютное преобладание Gly-A$^+$-клеток, составлявших 90,00 ± 2,54% от общего количества [43]. Содержание CD34$^+$-клеток при этом было 0,96 ± 0,31%, CD38-антиген, свойственный предшественникам лимфоидных гемопоэтических клеток, экспрессировали 2,15 ± 0,36% клеток, а CD45, маркер коммитированных предшественников лимфопоэза, экспрессировали 2,09 ± 0,32% клеток. Процент CD34$^+$CD45$^+$-клеток составлял 0,82±0,09%, содержание CD133$^+$-клеток – 0,39 ± 0,07%, причем большинство из них (около 70%) экспрессировали ещё и CD34.

При двойном окрашивании первичной суспензии ФПЧ моноклональными антителами к CD34 и CD38 выявлялось около 0,46 ± 0,18% клеток, характеризующихся фенотипом ранних кроветворных предшественников CD34$^+$CD38$^-$. Эти первичные элементы кроветворения на данной стадии развития дифференцируются преимущественно в первичные эритробласты и недифференцированные бластные элементы-предшественники лейкоцитов и нормобластической ветви эритрона [32], что в период печеночного кроветворения объясняет преобладание эритропоэза, необходимого для обеспечения эритроцитарной массой быстро увеличивающегося объема крови развивающегося плода.

Иммунофенотипирование лимфоидного ростка первичной суспензии ФПЧ, проведенное методом флуоресцентной микроскопии с использованием панели моноклональных антител к CD1, CD10, CD13, CD34, CD5, CD7, CD20, CD38 и HLA-DR, не выявило достоверной экспрессии клетками CD1, CD10, CD5 или CD20. Доля CD34$^+$-клеток составила 0,81 ± 0,25%, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами проточной цитометрии. Экспрессия молекулы CD13, характерной как для предшественников миелопоэза, так и клеток стромы, была выявлена на 0,57 ± 0,12% клеток. CD45$^+$-клетки составляли 2,65 ± 0,32%. Экспрессия CD7 была характерна для 0,44 ± 0,13% клеток суспензии ФПЧ, причём около половины CD7$^+$-клеток экспрессировали также HLA-DR. В целом HLA-DR экспрессировали 7,72 ± 1,38% клеток первичной суспензии ФПЧ. Таким образом, доля лимфоидно коммитированных клеток в ФПЧ первого триместра гестации относительно

мала. Наличие в ФПЧ клеток, способных к экспрессии маркера HLA-DR, может быть обусловлено его экспрессией не только на лимфоидных, но и на эритроидных клетках (Gly-A$^+$), не участвующих в иммунном ответе.

Стандартным методом идентификации и оценки функциональной активности кроветворных СК и КП является определение их колониеобразующей активности – способности образовывать колонии и генерировать зрелые клетки крови при культивировании в полутвердых средах. Нами использовалась метилцеллюлозная среда MethoCult H4434 (Stem Cell Technologies, Канада), содержащая эритропоэтин, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов, интерлейкины, фактор роста стволовых клеток.

При культивировании свежевыделенной клеточной суспензии ФПЧ 8–10 недель гестации в среде MethoCult H4434 колонии выявлялись уже на 5-е сутки после посева *in vitro*, однако четко различимые по форме и составу входящих в них клеток 6 типов колоний обнаруживались лишь на 12–14 сутки. Общее число гемопоэтических колоний на 14-е сутки культивирования было 253 ± 12 на 10^5 эксплантированных в культуру клеток. При этом основную часть составляли ранние колонии: миелоидно-эритроидного типа КОЕ-ГЭММ (46 ± 5), эритроидного типа БОЕ-Э (68 ± 6) и гранулоцитарно-макрофагальные колонии КОЕ-ГМ (54 ± 4). Более зрелые гемопоэтические КОЕ, способные генерировать потомство только одного миелоидного или эритроидного ростка (КОЕ-Г, КОЕ-Э и КОЕ-М), в свежевыделенной суспензии ФПЧ первого триместра гестации были представлены значительно меньшим и примерно одинаковым количеством. Корреляционный анализ содержания клеток различного иммунофенотипа, а также количества и типа генерируемых колоний показал, что число наиболее ранних смешанных колоний КОЕ-ГЭММ и КОЕ-ГМ положительно коррелирует с содержанием CD34$^+$- и CD133$^+$-клеток.

Таким образом, в ФПЧ первого триместра гестации на фоне численно преобладающих эритроидно коммитированных клеток разной степени зрелости мультипотентные кроветворные СК и КП составляют минорную популяцию. Их представленность в первичной суспензии по разным методам идентификации не превышает 0,5% от общего количества клеток.

Для научно обоснованной разработки методов консервирования клеток необходимо знать биофизические параметры, отражающие особенности взаимодействия клеток с компонентами среды на этапах низкотемпературного консервирования: коэффициенты проницаемости плазматической мембраны для воды (L_p) и криопротектора (P_{DMSO}), соответствующие энергии активации транспорта, осмотически неактивный объём (V_b). Это позволяет проводить соответствующую оптимизацию метода консервирования.

Осмотически неактивный объём претендентов на кроветворные СК, $CD34^+CD38^-$-клеток, определялся путём измерения объёма (V) клеток, суспендированных в растворе различной тоничности (C). Объём клеток, окрашенных специфическими моноклональными антителами CD34-FITC/CD38-PE, определяли методом анализа микрофотографий. Для определения величины осмотически неактивного объёма данные представляли в виде зависимости $V/V_0(C_0/C)$ – графика Бойля – вант-Гоффа, где V_0 и C_0 соответствуют изотоническим условиям. Зависимость аппроксимировали, исходя из линейного приближения, что соответствует гипотезе «идеального осмометра»:

$$\frac{V}{V_0} = \left(1 - \frac{V_b}{V_0}\right)\frac{C_0}{C} + \frac{V_b}{V_0}, \qquad (1)$$

где V_b – предельный объём, соответствующий бесконечному увеличению осмолярности ($C_0/C \to 0$).

Исследования показали, что $CD34^+CD38^-$-клетки ведут себя как идеальные осмометры в диапазоне 0,3–1,0 Осмоль/кг. Проведенные расчеты [42] позволили установить, что осмотически неактивный объём $CD34^+CD38^-$-клеток составляет в среднем 48% от изотонического объёма клетки. Объем клеток в изотонических условиях (V_0) составляет в среднем 399 мкм^3, и соответственно величина осмотически неактивного объёма для $CD34^+CD38^-$-клеток равна 191 мкм^3. Полученное значение V_b для $CD34^+CD38^-$-клеток ФПЧ оказалось значительно выше, чем для клеток этого фенотипа, выделенных из костного мозга, кордовой и периферической крови, которые по данным других исследователей [19, 46] составляют 21, 32 и 29% соответственно.

Для определения коэффициента проницаемости клеток для воды были использованы данные об объеме клеток, полученные двумя методами – флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Для флуоресцентной микроскопии окрашенные моноклональными антителами клетки иммобилизировали на покровном стекле при помощи поли-L-лизина в среде тоничностью 0,30 Осмоль/кг. После этого клетки экспонировались в гипертонической (1,00 Осмоль/кг) среде при комнатной температуре (22°C). В этих условиях вода покидала клетки по градиенту химического потенциала, объём клеток быстро уменьшался и по достижении равновесия оставался постоянным. Кинетику осмотической реакции $CD34^{+}CD38^{-}$-клеток регистрировали с помощью микроскопа с видеоприставкой, совмещённой с компьютером. Измерения проводили в течение достаточно короткого интервала времени (минуты), поэтому влияние физиологической регуляции объёма клеток, обеспечиваемой работой ион-транспортных систем, не учитывалось. Значение коэффициента проницаемости для воды (L_p) рассчитывали численно методом наименьших квадратов согласно модели:

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{A}{V_0} L_p RTC_n^0 \left(1 - \frac{1}{y}\right), \qquad (2)$$

где $y = V/V_0$ – относительный объём клетки; t – время, с; A – площадь поверхности мембраны, мкм^2; R – универсальная газовая постоянная, 8,31 Джмоль$^{-1}$К$^{-1}$; T – абсолютная температура, К; C_n^0 – концентрация соли во внеклеточной среде, моль/кг. Рассчитанное таким образом значение L_p составило $(0{,}37 \pm 0{,}05)\times10^{-13}$ мс$^{-1}$Па$^{-1}$.

Для определения коэффициента проницаемости методом проточной цитометрии кроветворные КП окрашивали моноклональными антителами CD34-FITC, суспендировали в среде тоничностью 0,30 Осмоль/кг и наслаивали на гипертонический градиент Percoll в пробирке для проточной цитометрии. В ходе измерения клетки быстро смешивали с гипертоническим раствором, что приводило к оттоку воды во внеклеточную среду и уменьшению объёма клеток. Коэффициент L_p, определённый с использованием данных метода проточной цитометрии, достоверно не отличался

от показателя, полученного ранее методом флуоресцентной микроскопии, и составлял $(0{,}48 \pm 0{,}05)\times10^{-13}$ мс$^{-1}$Па$^{-1}$.

Относительно низкий (по сравнению с другими типами гемопоэтических клеток) коэффициент проницаемости $CD34^+CD38^-$-клеток для воды может препятствовать их дегидратации при замораживании и регидратации при отогреве. Вследствие этого, с одной стороны, увеличивается вероятность внутриклеточного кристаллообразования, а с другой – уменьшается время действия «эффекта раствора». При этом в сочетании с высокой величиной осмотически неактивного объёма и поверхностно-объёмного отношения низкие значения коэффициента проницаемости для воды могут оказаться не столь критическими для выживаемости клеток после замораживания.

Для криоконсервирования гемопоэтических СК и КП обычно используют проникающие криопротекторы, среди которых наиболее часто применяют диметилсульфоксид (ДМСО). Для определения коэффициента проницаемости $CD34^+CD38^-$-клеток ФПЧ для ДМСО (P_{DMSO}) с использованием данных, полученных методом флуоресцентной видеомикроскопии, иммобилизированные клетки экспонировали в 5%-м растворе ДМСО тоничностью 0,70 Осмоль/кг при температурах 22 и 12°С.

При экспозиции в среде с ДМСО происходило быстрое обезвоживание клеток, объём клеток восстановливался до первоначальных значений за более длительное время (рис. 5), с уменьшением температуры процесс трансмембранного массообмена замедлялся.

Транспортные коэффициенты, коэффициент проницаемости для воды (L_p), коэффициент проницаемости для ДМСО и коэффициент отражения σ определяли при аппроксимации экспериментальных зависимостей $V/V_0(t)$ численным решением системы уравнений:

$$\begin{cases} \dfrac{dy}{dt} = -\dfrac{A}{V_0} L_p RT \left\{ C_n^0 \left(1 - \dfrac{V_0}{yV_0 - V_b - n\nu} \right) + \sigma \left(C_s^0 - \dfrac{n}{yV_0 - V_b - n\nu} \right) \right\}; \\ \dfrac{dn}{dt} = \dfrac{V_0}{2}(1-\sigma) \left(C_s^0 + \dfrac{n}{yV_0 - V_b - n\nu} \right) \dfrac{dy}{dt} + P_{DMSO} A \left(C_s^0 - \dfrac{n}{yV_0 - V_b - n\nu} \right) \end{cases} \quad (3)$$

где C_s^0 – концентрация криопротектора во внеклеточной среде, моль/кг; n – число моль криопротектора во внутриклеточной среде, моль; P_{DMSO} – коэффициент проницаемости мембраны клетки для ДМСО, мс$^{-1}$; n – парциальный молярный объём криопротектора, равный 6,9×10^4 мкм^3/моль для ДМСО.

Полученные результаты свидетельствуют, что CD34$^+$CD38$^-$-клетки хорошо проницаемы для ДМСО, их объём способен восстанавливаться практически до первоначального значения уже к 160 с экспозиции при 22°С. Транспортные коэффициенты, которые рассчитаны в результате обработки зависимостей $V/V_0(^t)$, полученных при T = 22°С, составляли: L_p = (0,45 ± 0,05)×10^{-13}мс$^{-1}$Па$^{-1}$, P_{DMSO} = (0,35 ± 0,02)×10^{-7}мс$^{-1}$, коэффициент отражения σ = 0,63 ± 0,03.

При экспозиции клеток с раствором ДМСО при 12°С дегидратация и регидратация происходят более плавно, что связано с замедлением процессов трансмембранного переноса. В рамках используемой модели это проявляется в уменьшении значений транспортных коэффициентов клеток: L_p = (0,25 ± 0,05)×10^{-13}мс$^{-1}$Па$^{-1}$, P_{DMSO} = (1,07 ± 0,04)×10^{-8}мс$^{-1}$, σ = 0,46 ± 0,05.

Исходя из предположения об аррениусовой зависимости кинетических параметров от температуры, значения L_p, P_{DMSO} и σ, измеренные при температурах 22 и 12°С, были использованы для определения значений энергий активации транспорта воды и ДМСО, которые составили 43,29 и 82,32 кДж/моль соответственно.

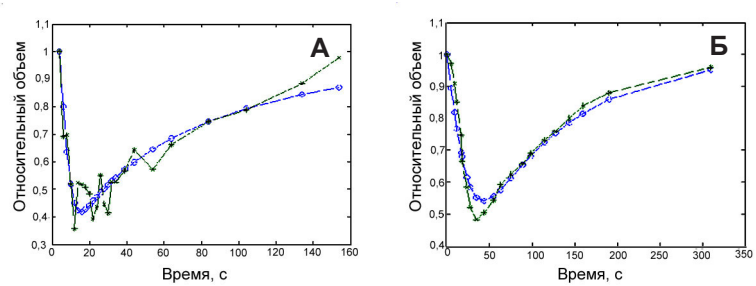


Рис. 5. Осмотическая реакция CD34$^+$CD38$^-$-клеток при экспозиции с 5%-м раствором ДМСО при 22°С (А) и 12°С (Б); крестики – экспериментальные данные $V/V_0(t)$, кружки – приближение наименьшими квадратами.

Полученные биофизические характеристики претендентов на кроветворные СК и КП, обладающих фенотипом $CD34^{+}CD38^{-}$, – значения транспортных коэффициентов и осмотически активного объёма – позволяют полагать, что наиболее вероятными повреждающими факторами для этих клеток при криоконсервировании являются осмотические эффекты на этапе оттаивания и отмывки от криопротектора, а также «эффект раствора», а не кристаллообразование.

В настоящее время для криоконсервирования клеток ФПЧ широко используется медленное двух- или трехступенчатое замораживание в среде, содержащей проникающий криопротектор ДМСО в концентрациях 5–10% [4]. Защитное действие ДМСО основано на быстром проникновении внутрь клетки и образовании большого числа водородных связей с жидкой фазой, что приводит, с одной стороны, к снижению вероятности образования внутриклеточных кристаллов льда, а с другой – к уменьшению концентрации внутриклеточных солей при субнулевых температурах. Основным недостатком ДМСО является токсичность, что определяет необходимость его удаления из клеток после оттаивания. Токсическое действие ДМСО обусловлено его взаимодействием с белками, нуклеиновыми кислотами, липидами и другими соединениями, что вызывает изменение структурных свойств биологических мембран и приводит к повреждению части клеток как на этапе эквилибрации, так и после отогрева. Кроме того, эффективные концентрации ДМСО (около 10%) при криоконсервировании оказывают сильное осмотическое действие, которое, как указывалось выше, является одним из наиболее вероятных повреждающих факторов для гемопоэтических СК и КП.

Традиционно для определения сохранности клеточных суспензий после криоконсервирования в качестве экспресс-теста используют окрашивание трипановым синим (ТС), которое дает интегральную оценку структурной целостности плазматической мембраны клеток. Мы для этой цели предлагаем применять более информативный Alamar Blue (AB)-тест, который по накоплению восстановленной флуоресцирующей формы индикатора AB в среде с клетками суммарно отображает и структурную целостность плазматической

мембраны, и активность окислительно-восстановительных ферментов разной внутриклеточной локализации [34] нативных и деконсервированных клеток.

Криоконсервирование суспензии клеток ФПЧ с использованием двухступенчатого замораживания со скоростью охлаждения 1 град/мин до –80°С с последующим погружением в жидкий азот в солевой среде Дюльбекко с 5% ДМСО приводило к более чем двукратному снижению показателя АВ-теста. Традиционным компонентом криоконсервирующих сред, позволяющим увеличить сохранность клеток, является телячья эмбриональная сыворотка (ЭС). Введение в среду криоконсервирования клеток ФПЧ 10% сыворотки позволило улучшить показатели АВ-теста на 40%. Однако присутствие ЭС крупного рогатого скота в составе криозащитных сред неперспективно с точки зрения возможного клинического применения клеток, так как не отвечает современным международным требованиям медицинской практики GMP.

Альтернативным путем для снижения концентрации ДМСО и повышения эффективности криоконсервирования клеток ФПЧ является сочетанное применение проникающих и непроникающих криопротекторов. Непроникающие криопротекторы обычно представляют собой высокомолекулярные полимеры, обладают низкой токсичностью и вызывают дегидратацию клеток до замораживания.

Для поиска соединений, способных оказывать защитное действие на клетки ФПЧ при замораживании-отогреве, был проведен скрининг различных соединений экзоцеллюлярного действия. В качестве таких соединений были выбраны сахароза, декстран (м. м. 100,000) и полиэтиленоксиды (ПЭО) различной молекулярной массы (м. м. 400, 1500, 3500, 8000). Эффективность непроникающих соединений оценивали по их способности оказывать криозащитный эффект как самостоятельно, так и в сочетании с различными концентрациями ДМСО по тесту окрашивания ТС. Из этого ряда были выбраны сахароза и ПЭО-8000, которые продемонстрировали более высокие результаты по сравнению с другими соединениями. Их наиболее эффективные конечные концентрации составляли 6% для ПЭО-8000 и 0,3 М для сахарозы.

В табл. 1 представлены результаты определения метаболической активности клеток ФПЧ по АВ-тесту после замораживания-

отогрева в присутствии выбранных экзоцеллюлярных криопротекторов. Метаболическая активность клеток, криоконсервированных в присутствии ПЭО-8000 и 5% ДМСО выше, чем без ПЭО, а присутствие сахарозы обеспечивает более высокие показатели даже при 2% ДМСО в среде криоконсервирования.

Представленные результаты характеризуют сохранение метаболической активности всех клеток в суспензии ФПЧ в целом. Оценка сохранности после криоконсервирования минорных популяций стволовых/прогениторных клеток, наиболее привлекательных для исследователей, может быть осуществлена с привлечением методов иммунофенотипирования и культивирования.

Проведенный иммунофенотипический анализ с двойным окрашиванием клеток моноклональными антителами CD34-FITC и CD38-RPE выявил, что криоконсервирование под защитой 5% ДМСО, независимо от присутствия в среде ПЭО-8000 или сахарозы, приводит к двукратному увеличению в суспензии клеток ФПЧ относительного содержания кроветворных СК и КП. Это «обогащение» криоконсервированной суспензии ФПЧ популяцией кандидатов в стволовые/прогениторные клетки происходит за счет потери части наиболее криолабильных клеток. Дополнительное окрашивание клеток 7-AAD (7-аминоактиномицин-D) при проведении проточной цитометрии позволило оценить сохран-

Таблица 1. Восстановление Alamar Blue клетками ФПЧ после криоконсервирования в средах, содержащих ДМСО и непроникающие криопротекторы (n = 6)

Криозащитный раствор	Условные единицы флуоресценции, УЕФ/лунку/10^6 клеток
Контроль (свежевыделенные клетки)	
–	20794 ± 252
После замораживания-отогрева	
5% ДМСО	9151 ± 989§
2% ДМСО + 6% ПЭО-8000	8835 ± 1191§
2% ДМСО + 0,3 М сахароза	13915 ± 848*§
5% ДМСО + 6% ПЭО-8000	13381 ± 1266*§
5% ДМСО + 0,3 М сахароза	16590 ± 205*§

Примечания: * – различия достоверны по сравнению с 5% ДМСО; § – различия достоверны по отношению к данным до замораживания-отогрева.

ность клеток данного фенотипа в суспензии. Оказалось, что криоконсервирование клеток ФПЧ с применением исследуемых криозащитных сред, указанных в табл.1, приводило к снижению сохранности $CD34^+CD38^-$-клеток на 15–20%. Таким образом, $CD34^+CD38^-$-клетки продемонстрировали относительно высокую криоустойчивость в выбранных условиях: их доля в общей суспензии ФПЧ после криоконсервирования увеличивалась и сохранность оставалась на высоком уровне.

Функциональную активность сохранившихся после криоконсервирования гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток оценивали по колониеобразованию в среде «MethoCult H4434». Как описывалось выше, свежевыделенные клетки ФПЧ образовывали гемопоэтические колонии 6 типов, и около 70% всех колоний составляли ранние колонии – КОЕ-ГЭММ, БОЕ-Э и КОЕ-ГМ. Криоконсервирование суспензии клеток ФПЧ под защитой 5% ДМСО приводило как к уменьшению общего количества образовавшихся гемопоэтических колоний на 24%, так и к изменению соотношения разных типов колоний в культуре (рис. 6). Наименее стойкими к криоконсервированию оказались клетки-предшественники, которые дают рост колониям макрофагального ряда: КОЕ-М, КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ. Число БОУ-Э и КОЕ-Г после криоконсервирования в присутствии 5% ДМСО не изменялось.

Клетки ФПЧ, криоконсервированные под защитой смеси криопротекторов 5% ДМСО и 6% ПЭО-8000, после отогрева не образовывали колоний на протяжении 14 суток культивирования в метилцеллюлозной среде. На 16-е сутки культивирования отмечено образование кластеров, состоящих из нескольких клеток сходной морфологии. Эти кластеры наблюдались до 20 суток культивирования, после чего деградировали, что может быть обусловлено обеднением к этому сроку среды культивирования из-за инактивации ростовых факторов и цитокинов, необходимых для полноценного развития колоний. Причиной значительной задержки (более 14 суток) реализации колониеобразующей активности клеток после криоконсервирования может быть специфическое взаимодействие высокомолекулярного ПЭО-8000 с компонентами плазматической мембраны. Ранее было показано [21], что высокомолекулярные полиэтиленоксиды образуют гидратную оболочку вокруг клеток,

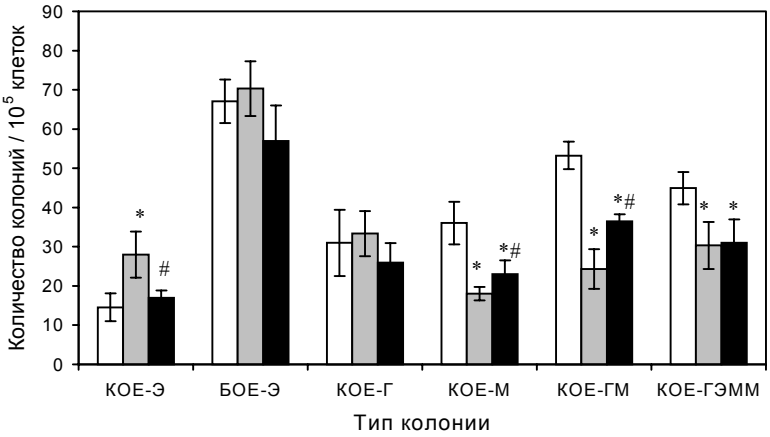


Рис. 6. Колониеобразующая активность свежевыделенных клеток ФПЧ (□) и после криоконсервирования под защитой 5% ДМСО (▨) и под защитой 5% ДМСО в присутствии 0,3 М сахарозы (■): * – различия достоверны по сравнению с показателями до криоконсервирования; # – различия достоверны по сравнению с показателями без сахарозы.

что защищает их мембраны от внешних воздействий и увеличивает время циркуляции в кровяном русле. Обработка эритроцитов высокомолекулярным ПЭО приводила к снижению аллореактивности клеток при трансплантации за счет маскировки поверхностных гликопротеинов на клеточных мембранах [10]. Свойство высокомолекулярных ПЭО экранировать реакционно активные центры лекарственных соединений и замедлять их деградацию в организме в настоящее время широко применяется в фармакологии. Можно полагать, что используемый в качестве криопротектора ПЭО экранирует рецепторы плазматической мембраны, ответственные за связывание с такими ростовыми факторами культуральной среды как эритропоэтин, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), фактор стволовых клеток (SCF), что и приводит к значительному угнетению колониеобразующей активности в выбранные сроки наблюдения.

Введение 0,3 М сахарозы в состав криозащитной среды с 5% ДМСО не влияло на скорость формирования и общее количество

колоний в культуре после замораживания-отогрева, однако позволяло в большей степени сохранить колонии макрофагального ряда КОЕ-М и КОЕ-ГМ. Из рис. 6 видно, что количество колоний этих типов было выше на 20 и 35% соответственно по сравнению со значениями, полученными после криоконсервирования клеток ФПЧ в среде без сахарозы. Количество КОЕ-ГЭММ оставалось без изменений.

В целом можно заключить, что претенденты на кроветворные СК и КП характеризуются достаточно высокой криоустойчивостью в выбранных условиях (двухступенчатое замораживание в присутствии 5% ДМСО со скоростью 1 град/мин до –80°С с последующим погружением в жидкий азот), на что указывает увеличение относительного количества $CD34^{+}CD38^{-}$-клеток в суспензии ФПЧ после отогрева. В то же время данный способ криоконсервирования приводит к частичной потере специфических функциональных свойств гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток – способности образовывать колонии при культивировании, что может быть связано с токсическим действием ДМСО. Использование комбинированных криозащитных сред (ДМСО + экзоцеллюлярный криопротектор) для снижения токсического эффекта ДМСО существенно не повлияло на относительное содержание и сохранность гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток в отогретой суспензии клеток ФПЧ. Включение 0,3 М сахарозы в состав криоконсервирующей среды на основе ДМСО способствовало сохранению колониеобразующей активности предшественников макрофагального ряда.

Оценка морфофункциональной сохранности после криоконсервирования общей суспензии ФПЧ другого типа клеток-предшественников, развивающихся из мезодермы, – мезенхимальных стромальных клеток, – объекта исключительного интереса со стороны исследователей в различных областях биологии и медицины [36] потребовала привлечения приемов селективного культивирования. Вследствие низкого содержания МСК в общей суспензии ФПЧ определение их свойств возможно только после выделения МСК в составе адгезивной фракции общей суспензии с последующей их экспансией в селективной среде в монослойной культуре.

При посеве свежевыделенной клеточной суспензии ФПЧ в условия монослойной культуры в концентрации (2–4)×10^4 клеток/$см^2$ образовывались разного размера дискретные колонии фибробластоподобных клеток (ФК), которые активно пролиферировали. Количество образовавшихся колоний, т. е. число колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф), оценивали на 14-е сутки культивирования. Оно составляло 2,8 ± 0,7 КОЕф/10^5 посеянных клеток, т. е. только лишь 0,002–0,003% клеток свежевыделенной общей суспензии ФПЧ способны образовывать колонии ФК на адгезивном пластике. При посеве меньше 2×10^4 клеток/$см^2$ колонии не выявлялись. Использование более высокой плотности посева приводило к формированию конфлуентного монослоя из ФК, в котором невозможно было оценить количество КОЕф. Первичные культуры адгезивных клеток ФПЧ с колониями ФК на 12–14-е сутки пересевали для экспансии МСК. Уже после первого пассажа ФК были преобладающим клеточным типом, и к 7 суткам культивирования их монослой достигал 60–70% конфлуента. Эти клетки имели иммунофенотип $CD4^-$, $CD29^+$, $CD33^-$, $CD34^-$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD105^+$, $HLA\text{-}DR^-$, $HLA\text{-}ABC^+$, характерный для МСК, и сохраняли его по меньшей мере в течение 4-х пассажей.

При культивировании полученных клеток в средах, содержащих соответствующие индукторы, они проявляли способность к направленной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях, что согласно современным представлениям является специфическим свойством мультипотентных МСК и их незрелых потомков [36]. В остеогенной культуре клетки пролиферировали, формируя компактные «островки». Среди веретеновидных фибробластоподобных клеток обнаруживались полигональные клетки с морфологией остеобластов. На 19-е сутки культивирования в остеогенной среде было до 40% клеток, окрашивающихся положительно на щелочную фосфатазу (ЩФ) (рис. 7, А). В адипогенной среде ФК быстро пролиферировали и формировали 90% конфлуентного монослоя на 7-е сутки. После культивирования в течение 19 суток в монослое обнаруживались клетки с внутриклеточными включениями нейтральных липидов, которые окрашивались красителем Oil Red O (рис. 7, В). Признаки спонтанных остеогенной или адипогенной дифференцировок в контрольных культурах (без

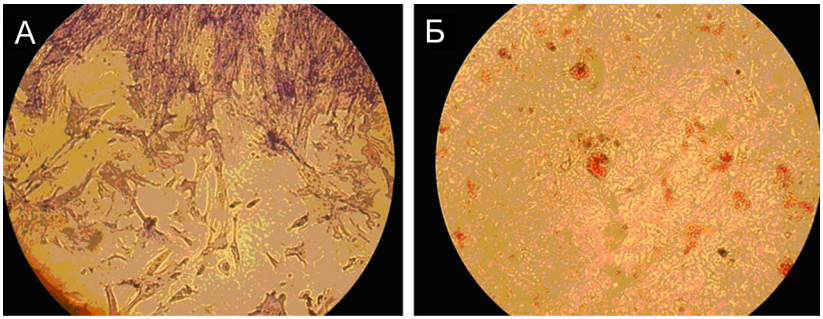


Рис. 7. Индуцированная остеогенная (А) и адипогенная (Б) дифференцировка МСК, полученных из фетальной печени человека: А – окрашивание на экспрессию ЩФ, ×100; В – окрашивание Oil Red O для выявления накопления нейтральных липидов, ×100.

добавок индукторов) на протяжении всего периода исследования не наблюдались.

Криоконсервирование общей суспензии клеток ФПЧ по традиционному режиму – двухступенчатое замораживание со скоростью 1 град/мин до –80°С в присутствии 5% ДМСО и 20% ЭС с последующим погружением в жидкий азот – влияло на поведение адгезивных клеток в условиях монослойной культуры. Хотя клетки и прикреплялись к культуральному пластику, значительная доля их не была способна к распластыванию. Адгезировавшие клетки переживали в первичной культуре до 7–9 суток, а затем постепенно деградировали. При культивировании клеток в селективных для МСК средах колониеобразование не наблюдалось. Изменение условий культивирования – увеличение посевных доз, введение в состав культуральной среды кондиционированной среды от соответствующих нативных контролей – не улучшало результаты культивирования. Замена солевой среды Дюльбекко в составе криозащитного раствора на культуральную среду также не приводила к положительным изменениям.

Для определения возможного вклада токсического действия ДМСО в эти негативные изменения было изучено поведение в монослойной культуре клеток ФПЧ, прошедших только этап экви-

либрации с криопротектором. Суспензию ФПЧ экспонировали в криозащитной среде, содержащей 5 или 10% ДМСО, в течение 20 мин при 4°С, после чего криопротектор отмывали, а клетки высевали на пластик. Оказалось, что жизнеспособность, морфологические характеристики и колониеобразующий потенциал ФК ФПЧ практически не изменялись после этапа эквилибрации в вышеуказанных условиях, т. е. ДМСО не являлся причиной наблюдаемых изменений свойств криоконсервированной суспензии ФПЧ. Экспонированные МСК, как и клетки свежевыделенной суспензии, активно прикреплялись, пролиферировали и были способны к индуцированной остеогенной и адипогенной дифференцировкам в культуре. При этом оказалось, что экспозиция с растворами ДМСО в указанных условиях при последующем культивировании в остеогенной среде приводила к увеличению на 40% количества МСК, позитивных на ЩФ, по сравнению с нативным контролем. Отмечено также, что образцы МСК, экспонированных с 5% ДМСО, при соответствующей индукции формировали большие по размеру остеогенные «островки» по сравнению с контролем и клетками, которые экспонировались с 10% ДМСО. Свойство ДМСО стимулировать дифференцировку клеток в культуре хорошо известно. Наши результаты показывают, что краткосрочный контакт МСК ФПЧ с ДМСО при температуре близкой к 0°С с последующим удалением криопротектора может влиять на реализацию их остеогенного потенциала, что требует дальнейшего изучения с точки зрения и клеточных технологий, и криобиологических исследований, касающихся создания банков МСК.

Таким образом, мы пришли к выводу о необходимости применения других режимов замораживания для криоконсервирования первичной суспензии ФПЧ с целью сохранения в ней пула ФК (табл. 2).

Применение режимов замораживания без инициации кристаллообразования (I –III) не обеспечивало сохранности адгезивного пула клеток ФПЧ после криоконсервирования. После посева отогретых первичных суспензий клеток ФПЧ в условия монослойного культивирования отмечали прикрепление клеточных элементов к пластику, однако процессы пролиферации и формирование фибробласти-

Таблица 2. Режимы замораживания суспензии ФПЧ

Режим	Описание режимов замораживания
I	первый этап – охлаждение со скоростью 1 град/мин до –40°С, второй – 10 град/мин до –80°С; третий – помещение в жидкий азот
II	первый этап – охлаждение со скоростью 1 град/мин до –20°С; второй – 10 град/мин до –60°С; третий – помещение в жидкий азот
III	первый этап - охлаждение со скоростью 1 град/мин до –20°С; второй – 5 град/мин до –60°С; третий -– помещение в жидкий азот
IV	первый этап – охлаждение (с инициацией кристаллообразования) со скоростью 1 град/мин до –20°С; второй – 5 град/мин до –60°С; третий – помещение в жидкий азот

ческих колоний не наблюдались. Анализ термограмм I–III режимов замораживания выявил наличие диапазона переохлаждения, составлявшего 6–10 град. Режим IV включал на первом этапе инициацию кристаллообразования (сидинг) путем непосредственного контакта дна криопробирок с парами жидкого азота, это обеспечивало уменьшение переохлаждения в системе до 3 градусов и менее и, как следствие, – более высокую сохранность, чем после замораживания-отогрева по режимам без сидинга, не только общего пула клеток ФПЧ, но и фракции, содержащей МСК. При культивировании клеток ФПЧ, замораживание которых выполняли по режиму IV, происходило формирование характерных колоний ФК, причем эффективность колониеобразования при этом равнялась $(0{,}4 \pm 0{,}1)\times10^{-3}$ и $(1{,}6 \pm 0{,}7)\times10^{-3}$% в образцах, криоконсервированных с 5 и 10% ДМСО соответственно. В нативном контроле этот показатель составил $(2{,}8 \pm 0{,}7)\times10^{-3}$%.

Последующее пассирование культур позволило оценить потенциальную способность колониеобразующих клеток к самоподдержанию. Уже на первом пассаже МСК ФПЧ, криоконсервированные с сидингом под защитой 5 и 10% ДМСО, формировали новые колонии, причем эффективность колониеобразования возрастала во много раз – до $118{,}2 \pm 17{,}0$ и $239{,}1 \pm 46{,}0$ колоний/10^5 клеток соответственно. Такое существенное увеличение могло быть связано с тем, что использование ДМСО с концентрацией 5 и 10% при ука-

занном режиме замораживания обеспечивало сохранность различных по степени коммитированности ФК ФПЧ. Таким образом, отогретые МСК из криоконсервированных образцов первичной общей суспензии клеток ФПЧ сохраняли способность к самоподдержанию, если были заморожены в соответствии с режимом IV программного замораживания, включающим сидинг, причем увеличение концентрации криопротектора ДМСО с 5 до 10% обеспечивало при этом более эффективную защиту МСК в суспензии ФПЧ. Также МСК сохраняли потенциал к индуцированным дифференцировкам в остеогенном и адипогенном направлениях.

Известно, что индукция формирования внеклеточного льда (сидинг) при отрицательных температурах, близких к температуре замерзания равновесной смеси, во время медленного охлаждения является целесообразной при криоконсервировании разных типов клеток [50]. Применение сидинга при замораживании первичной суспензии ФПЧ позволило сохранить важное свойство МСК – способность к колониеобразованию [39]. Это свидетельствует о том, что МСК в составе первичной суспензии ФПЧ чувствительны к переохлаждению. Чувствительность к переохлаждению МСК в составе свежевыделенной клеточной суспензии ФПЧ может быть связана с исходным состоянием адгезивных клеток, полученных в процессе дезагрегации фетальной печени, что неизбежно связано с нарушениями плазматической мембраны и цитоскелета этих клеточных элементов, способных тем не менее восстанавливаться в ходе последующего культивирования.

Наши результаты согласуются с другими работами, в которых показано, что человеческие эмбриональные стволовые клетки обладают высокой чувствительностью к переохлаждению, а успешное их криоконсервирование может быть достигнуто при использовании протоколов медленного охлаждения с сидингом [50].

В отдельной серии экспериментов мы показали, что МСК, прошедшие несколько пассажей *in vitro* перед процедурой криоконсервирования, являются более криоустойчивыми, чем свежевыделенные, и не нуждаются в усложнении режима замораживания: после двухступенчатого медленного замораживания они сохраняют свои фенотипические особенности, пролиферативный и дифференцировочный потенциалы [7].

Значимость особенностей подготовки свежевыделенных гетерогенных клеточных суспензий фетальных тканей к замораживанию-отогреву и условий восстановления этих клеток после отогрева весьма выражена при криоконсервировании нейральных клеток (НК) – производных эктодермы. Структурные особенности нервной ткани обуславливают повреждение значительной части клеток при использовании как механического [35], так и ферментативно-механического способов ее дезагрегации [5]. Сохранность клеток, полученных из фетальной нервной ткани человека и головного мозга плодов и новорожденных крыс, по нашим результатам, не превышает 70% по тесту ТС [5, 6].

Свежевыделенные НК уже через несколько часов после внесения в среду DMEM/F12 с 10% ЭС при 37°С образовывали плавающие многоклеточные агрегаты. При этом размер и плотность упаковки агрегатов зависели от сохранности клеточных элементов исходной суспензии. При низкой сохранности клетки формировали мелкие рыхлые агрегаты, которые в процессе культивирования не прикреплялись к подложке и в дальнейшем погибали. При культивировании агрегатов, имеющих в своем составе большое количество сохранных по ТС НК, на протяжении 1-2 суток отмечалось увеличение числа жизнеспособных клеток: если исходная сохранность по ТС свежевыделенных НК была в пределах 70%, то прекультивирование в составе агрегатов позволяло получить суспензии НК с 87 ± 5% сохранных клеток. Упаковка их становилась более плотной, и агрегаты превращались в компактные сфероиды (рис. 8).

После пересева такие сфероиды прикреплялись к поверхности культурального сосуда, часть клеток из них мигрировала, формируя зоны роста, которые в дальнейшем служили стромой для миграции и развития нейральных клеток и колоний СК и КП (рис. 9).

Эти наблюдения позволяют предположить, что агрегация НК обеспечивает им микроокружение, способствующее репарации повреждений, полученных клетками в результате выделения. Таким образом, краткосрочное культивирование свежеизолированных НК перед криоконсервированием можно рассматривать как этап подготовки этих клеток к последующему замораживанию-отогреву;

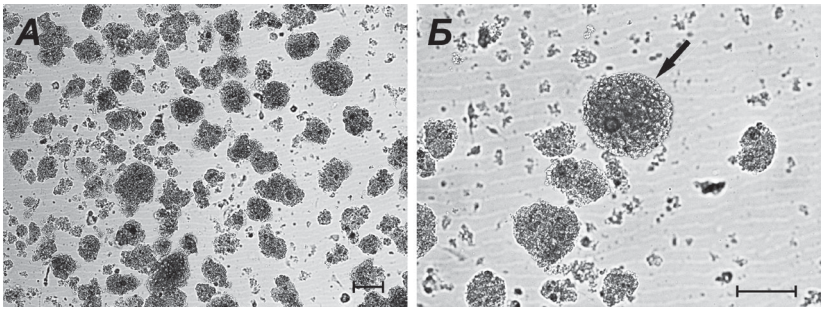


Рис. 8. Свежеизолированные НК новорожденных крыс в условиях культивирования, прижизненное наблюдение: А – плавающие многоклеточные агрегаты, 3 ч культивирования; Б – образовавшиеся сфероиды (стрелка), 24 ч культивирования. Масштаб 100 мкм.

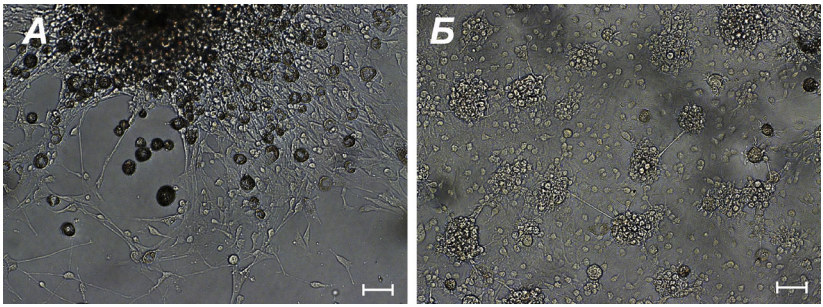


Рис. 9. Поведение НК при монослойном культивировании. Прижизненное наблюдение: А – миграция НК из прикрепленного агрегата, формирование зоны роста, 2 суток культивирования; Б – формирование кластеров малодифференцированных клеток на монослое из глии, 14 суток культивирования. Масштаб 50 мкм.

в ходе этого этапа происходят восстановление НК с нелетальными дефектами и элиминация клеток с летальными повреждениями.

Дальнейшее изучение состояния НК при криоконсервировании потребовало оценки влияния на них компонентов криозащитной среды, в первую очередь общепринятого криопротектора ДМСО, а также эмбриональной телячьей сыворотки, позволяющей увеличивать при замораживании-отогреве сохранность клеток.

Свежевыделенные НК были чувствительны к присутствию ДМСО в криопротекторных средах. Эквилибрация НК в течение 15 мин при 4°С со средами, включающими разные концентрации ДМСО, приводила к значительному снижению сохранности клеток по тесту ТС и уменьшению их количества, уже начиная с концентрации ДМСО 7,5% (рис. 10). Включение в эти среды 10% ЭС не влияло на показатели сохранности НК по ТС (рис. 10).

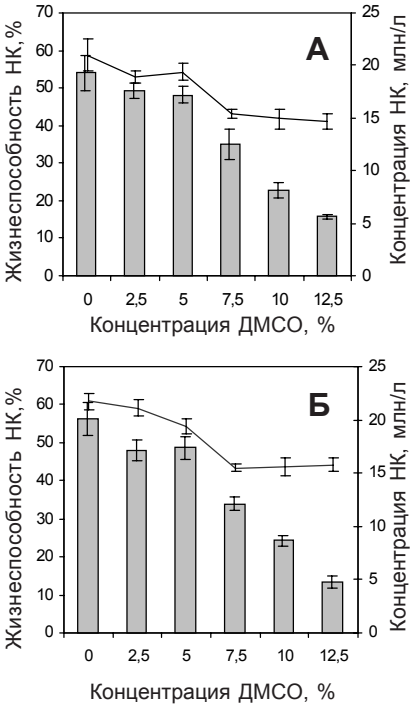


Рис. 10. Влияние ДМСО и ЭС на сохранность (▭) и концентрацию (——) изолированных НК плодов крыс: А – без сыворотки; Б – с сывороткой.

Криоконсервирование НК путем двухступенчатого замораживания со скоростью охлаждения 1 град/мин до –80°С с последующим погружением в жидкий азот в среде DMEM/F12 без криопротектора приводило к потере сохранности и количества клеток на 60 и 67% соответственно. Присутствие в среде замораживания ДМСО в концентрациях 2,5–12,5% улучшало сохранность НК, оцененную по тесту ТС. При этом большее количество жизнеспособных клеток наблюдалось при использовании концентраций криопротектора 5 и 7,5%, а наличие ЭС в криозащитной среде не влияло на показатели прижизненного окрашивания.

Последующее культивирование отогретых НК показало, что наибольшее количество жизнеспособных клеток сохраняется при использовании ДМСО в концентрациях 7,5 и 10%, причем присут-

ствие ЭС в криозащитной среде является обязательным условием. Нейральные клетки, криоконсервированные без сыворотки или с ДМСО в концентрациях ниже 5%, при последующем культивировании формировали только мелкие рыхлые и бесформенные агрегаты, отмечалось большое количество плавающих одиночных клеток. Прикрепление и распластывание агрегатов не происходили, и клетки погибали. НК, криоконсервированные с сывороткой и 5–12,5% ДМСО, в культуре формировали агрегаты среднего размера, часть которых в ходе культивирования сливалась, уплотнялась и прикреплялась к подложке. На 3–4 сутки 90% клеточных агрегатов прикреплялись к пластику, из них происходило выселение клеток, обладающих морфологией глиальных клеток. На 4–6 сутки наблюдалось формирование зон роста в виде участков монослоя, на 7–10 сутки на них появлялись клетки, по внешним признакам сходные с нейробластами (рис. 11, А), на 10–16 сутки обнаруживались колонии нестин- и виментин-положительных клеток (рис. 11, В,С). В ходе дальнейшего культивирования эти колонии увеличивались в размерах.

Следовательно, для эффективного криоконсервирования НК целесообразно использование криозащитных сред, содержащих ЭС и криопротектор ДМСО в концентрациях 7,5–10%. Кроме того, необходимым этапом успешного криоконсервирования НК следует считать прекультивирование свежевыделенной суспензии этих клеток, которое создает условия, способствующие репарации повреждений и увеличению выживаемости клеток после их выделения. Наличие клеточных агрегатов играет определяющую роль и в сохранности свойств деконсервированных НК, проявляющихся в культуре. При культивировании одиночных НК, полученных в результате разрушения деконсервированных агрегатов при удалении ДМСО с использованием центрифугирования, реагрегация не происходит, клетки не прикрепляются к подложке и в дальнейшем погибают. При культивировании деконсервированных целых агрегатов наблюдаются их прикрепление к пластику и миграция клеток, образующих монослойную зону роста, в составе которой позднее формируются кластеры и колонии стволовых/прогениторных клеток. Отличительным свойством поведения *in vitro* такого деконсер-

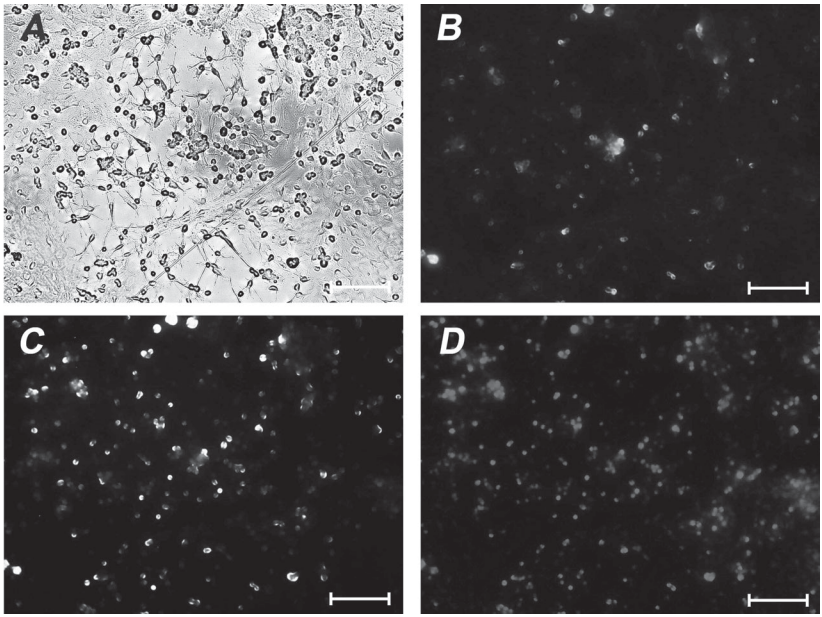


Рис. 11. Иммуноцитохимическое окрашивание криоконсервированных НК новорожденных крыс после 14 суток культивирования. Первичная культура пролиферирующих клеток (A) демонстрирует высокий уровень нестин- (B) и виментин-положительных (C) клеток. Ядра клеток были окрашены красителем Hoechst (D). Масштаб 100 мкм.

вированного биоматериала по сравнению с исходными субкультивированными агрегатами является более позднее прикрепление агрегатов и следующих за ним событий в культуре.

Таким образом, культивирование НК в составе агрегатов позволяет восстановить повреждения, полученные клетками в процессе их выделения и криоконсервирования. При этом сохранение целостности клеточных агрегатов после криоконсервирования является необходимым условием для выживания НК в культуре.

Использованный для криоконсервирования фетальных клеток режим двухступенчатого медленного замораживания рекомен-

дуется для многих типов клеток [15]. Его реализация сопровождается формированием и ростом внеклеточных кристаллов льда, существенными изменениями осмотического давления, изменением объема клетки и др., что, в свою очередь, может приводить к существенным модификациям плазматической мембраны и собственно цитоскелета клеток. Известно[28], что состояние цитоскелета МСК играет ключевую роль на этапе выбора направления их дифференцировки. Соответственно, криоконсервирование, основанное на медленном замораживании, может влиять на реализацию дифференцировочного потенциала МСК. На примере МСК, выделенных из ФПЧ и фетальных тканей мезодермального происхождения, мы показали, что медленное замораживание МСК под защитой ДМСО способно индуцировать их вступление в дифференцировку в остеогенном и адипогенном направлениях *in vitro* [7, 39].

Альтернативой медленному замораживанию является витрификация. Витрификация, как метод сверхбыстрого замораживания, обеспечивающий переход криобиологической системы в стекловидное состояние без кристаллообразования, позволяет минимизировать криоповреждение клеток [17], а также значительно ускоряет и облегчает процесс криоконсервирования, поскольку не требует специального дорогостоящего оборудования. Витрификация в настоящее время является методом выбора при консервировании таких сложных биологических систем, как ткани [16, 24] и тканеинженерные конструкции [40].

Для витрификации клеток и тканей животного происхождения, как правило, применяют криозащитные среды в виде одно- или многокомпонентных растворов криопротекторов ДМСО, этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД). Из перечисленных криопротекторов наилучшей стеклообразующей способностью обладает 1,2-ПД [12], однако существуют данные [23] о токсичности этого соединения в концентрациях, необходимых для витрификации. ДМСО в высоких концентрациях также оказывает выраженный токсический эффект [47]. ЭГ менее токсичен для эмбрионов мыши и крысы, чем ДМСО [29], однако он не обладает высокой стеклообразующей способностью [11]. В настоящее время для витрификации

эмбрионов различных видов млекопитающих широко применяется ЭГ в комбинации с ДМСО [51, 52]. Показано также [25], что введение сахаров в состав криозащитных сред влияет на скорость охлаждения, необходимую для витрификации, и позволяет уменьшить концентрацию проникающих криопротекторов.

Мы поставили задачу изучить возможность эффективного криоконсервирования суспензии МСК человека путем витрификации в пластиковых криопробирках. Исследования проводились на МСК, полученных из фрагментов тканей мезодермального происхождения эмбрионов человека 5–6 недель гестации. Для выделения и экспансии МСК в культуре были использованы те же методические подходы, что и в случае МСК ФПЧ. В эксперимент брали клетки с четвертого пассажа. Принадлежность полученных клеток к МСК подтверждалась их морфологией, поведением при монослойном культивировании, характерным иммунофенотипом ($CD29^+$ $CD34^-CD38^-CD44^+CD45^-CD73^+CD105^+$) и способностью к индуцированным дифференцировкам в остеогенном и адипогенном направлениях.

Выбор состава витрифицирующегося раствора определяет его стеклообразующую способность, токсичность и, в конечном итоге, эффективность витрификации биологических объектов. Идеальный витрифицирующийся раствор должен обладать низкой токсичностью и способностью переходить в стеклообразное состояние при быстром замораживании. Показано, что комбинирование в составе криозащитного раствора криопротекторов с различными механизмами токсичности позволяет уменьшить степень токсичности раствора без снижения его стеклообразующей способности [16]. Основываясь на этом, в состав витрифицирующихся растворов включали ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозу. В результате визуального скрининга были выбраны два раствора с наименьшими концентрациями криопротекторов, при быстром замораживании и отогреве которых не наблюдали развития кристаллизации. Растворы обозначили ДЭПС-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% 1,2-ПД, 0,5 М сахарозы) и ДЭПС-2 (10% ДМСО, 15% ЭГ, 15% 1,2-ПД, 1 М сахарозы). С помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что при быстром замораживании путем погру-

жения образцов в жидкий азот растворы ДЭПС-1 и ДЭПС-2 переходят в аморфное состояние. Было установлено, что критическая скорость отогрева, при которой не развивается процесс кристаллизации, для раствора ДЭПС-1 меньше, чем для раствора ДЭПС-2. Однако, исходя из того, что ДЭПС-2 содержит меньшую суммарную концентрацию криопротекторов, и, следовательно, может быть менее токсичным, в экспериментах по витрификации суспензии МСК использовали оба раствора.

Экспозицию суспензий МСК с витрифицирующимися растворами криопротекторов проводили при комнатной температуре в криопробирках в два этапа. На первом этапе клетки в течение 1 мин инкубировали в растворе, содержащем 5% ДМСО, 10% ЭГ, 10% 1,2-ПД, 0,25М сахарозы. Затем суспензию смешивали с концентрированным раствором криопротекторов до достижения необходимых конечных концентраций. Через 15–20 с полученную суспензию объемом 0,5 мл в криопробирке погружали в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при 40°С. Для удаления криопротекторов суспензию МСК разводили 0,5 М раствором сахарозы в среде культивирования и центрифугировали.

Для изучения возможности витрификации МСК в растворах ДЭПС-1 и ДЭПС-2 определяли ряд параметров жизнеспособности клеток: сохранность – по экспресс-тесту ТС, метаболическую активность – по АВ-тесту, эффективность адгезии – по проценту прикрепившихся к культуральному пластику клеток. Как видно из табл. 3, в контрольной группе (до криоконсервирования) сохранность МСК ранних стадий органогенеза, оцененная по окрашиванию ТС, составляла (90,3 ± 2,9)%, интенсивность флуоресценции АВ, отражающая суммарную метаболическую активность клеток, – 29630 ± 3499 УЕФ/лунка, а эффективность адгезии – 94,2 ± 2,8%.

После экспозиции МСК в растворах ДЭПС-1, ДЭПС-2 и удаления криопротекторов наблюдалось снижение всех исследуемых показателей примерно на 20% по сравнению с контрольной группой. Подобный эффект после экспозиции с высокими концентрациями криопротекторов, используемыми для витрификации, а также с многокомпонентными витрифицирующимися растворами

Таблица 3. Влияние экспозиции с витрифицирующимися растворами и витрификации на жизнеспособность МСК (n = 15)

Экспериментальные группы	Сохранность по окрашиванию ТС, %	Интенсивность флуоресценции АВ, УЕФ×10^3/лунку	Эффективность адгезии, %
Контроль	90,3 ± 2,9	29,6 ± 3,5	94,2 ± 2,8
Экспозиция с раствором + отмывка криопротекторов			
ДЭПС-1	71,7 ± 2,1*	23,7 ± 3,9	75,4 ± 4,1*
ДЭПС-2	71,8 ± 2,6*	25,5 ± 2,5	77,9 ± 4,4*
Экспозиция с раствором, быстрое охлаждение-отогрев + отмывка от криопротекторов			
ДЭПС-1	70,6 ± 2,8*	18,4 ± 4,9*	55,1 ± 5,9*
ДЭПС-2	39,9 ± 4,1*	7,4 ± 1,9*	35,5 ± 3,5*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

описан и другими авторами [26, 41, 48]. Так, T. Takahashi *et al.* [41] при экспозиции моноцитов человека в растворе с суммарной концентрацией криопротекторов 52% наблюдали снижение сохранности клеток на 10%, фагоцитарной активности – на 50%, способности к хемотаксису – на 75%. B.L. Liu *et al.* [26] описали значительное снижение жизнеспособности остеобластов при экспозиции с растворами ДМСО и 1,2-ПД в концентрации 30%. M.C. Wusteman *et al*. [47] наблюдали снижение пролиферативной активности эндотелиальных клеток линии ECV304 после экспозиции в 45%-х растворах ДМСО, 1,2-ПД, ЭГ и 2,3-бутандиола.

Исследование морфофункциональных свойств МСК человека ранних стадий органогенеза после витрификации в растворах ДЭПС-1 и ДЭПС-2 выявило существенную разницу их эффективности (табл.3). Так, после витрификации суспензии МСК в ДЭПС-1 сохранность клеток по ТС снижалась на 20%, метаболическая активность по АВ-тесту – на 38% и эффективность адгезии – на

39% по сравнению с показателями до витрификации, наблюдались прикрепление, распластывание и пролиферация МСК. После витрификации в ДЭПС-2 снижение перечисленных показателей составляло 50, 75 и 60% соответственно, при этом около 70% прикрепившихся к культуральному пластику клеток были неспособны к распластыванию, оставались округлыми и при дальнейшем культивировании погибали. Следует отметить, что в процессе отогрева суспензии МСК, витрифицированных в ДЭПС-2, макроскопически выявлялись признаки развития кристаллизации (помутнение образца, белая окраска), хотя при охлаждении-отогреве ДЭПС-2 в отсутствие клеток кристаллизация не наблюдалась; вероятно, клетки выступали в качестве центров кристаллизации. Полученные результаты указывают на то, что повреждение клеток при использовании ДЭПС-1 обусловлено в основном токсичностью компонентов раствора, а при использовании ДЭПС-2 – как токсичностью раствора, так и повреждающим действием кристаллизации на этапе охлаждения-отогрева.

Исследование дифференцировочного потенциала МСК после экспозиции с ДЭПС-1 и после витрификации под защитой этого раствора показало, что при культивировании МСК в индуцирующих остеогенной и адипогенной средах наблюдались экспрессия щелочной фосфатазы и отложение минерализованного матрикса или появление Oil Red O – положительных клеток, содержащих вакуоли нейтральных липидов, соответственно.

Приведенные данные показывают, что применение раствора ДЭПС-1 для витрификации МСК человека ранних стадий органогенеза позволяет сохранить их жизнеспособность и потенциал к индуцированной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Показатели сохранности клеток после витрификации в растворе ДЭПС-1 по окрашиванию ТС сопоставимы с результатами, полученными в работе Wang H.-Y. *et al.*[45]: 70,6 ± 2,8 и 71,2% соответственно. Согласно Todorov P. *et al.* [44], жизнеспособность клеток после витрификации в растворе, содержащем 20% ДМСО, 20% ЭГ и 0,5 М сахарозы, составляла 86 ± 4,7%, однако в указанных работах в качестве криоконтейнеров были использованы соломинки и витрификацию суспензии клеток выполняли в объеме

0,25 мл, тогда как мы использовали криопробирки и витрифицировали суспензию в объеме 0,5 мл, что более предпочтительно для хранения СК в низкотемпературных банках.

В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения метода витрификации для криоконсервирования культивированных МСК человека и могут быть основой для разработки методов криоконсервирования более сложных конструкций, содержащих МСК.

Ткани плода первого триместра гестации, которые являлись объектом представленного исследования, так же как и ткани взрослого человека, гетерогенны по своему клеточному составу, т. е. в их формировании одновременно участвуют клетки нескольких типов. Однако соотношение клеток различных типов и даже сами типы клеток в них значительно отличаются, что можно проиллюстрировать на примере печени: если клеточный состав печени взрослых на 90% представлен гепатоцитами, то большинство клеток фетальной печени экспрессируют гликофорин А, т. е. являются эритроидными. Рассматривая эритроидный росток в фетальной печени, можно выявить клетки всех стадий развития от эритробластов до эритроцитов с преобладанием переходных форм. В фетальном мозге клетки также, в основном, представляют собой не окончательно дифференцированные предшественники.

Следующая особенность фетальных тканей – незавершенность развития входящих в их состав клеток. Если органы и ткани взрослого в подавляющем большинстве состоят из окончательно дифференцированных клеток, то большая часть фетальных клеток является клетками-предшественниками, производными стволовых клеток разной степени дифференцировки. Например, фетальная печень характеризуется относительно высоким содержанием гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток. При объемном культивировании в полутвердых средах в присутствии соответствующих ростовых факторов и цитокинов они образуют ранние унипотентные (БОЕ-Е) и смешанные (КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ) колонии, которые составляют основную массу образующихся колоний. Это свойство, а именно высокое содержание колониеобра-

зующих клеток, является отличительной особенностью фетальных тканей.

В фетальной печени мы выявили клеточные элементы, относящиеся к четырем росткам: гемопоэтическому, гепатическому, мезенхимальному и эндотелиальному. Гемопоэтический росток был представлен клетками, обладающими специфической морфологией, характерным иммунофенотипом и способностью формировать зрелые потомки при культивировании в полутвердых средах. Клетки гепатического ростка, легко выявляемые на электронно-микроскопических микрофотографиях, в условиях культуры экспрессировали маркеры незрелых (α-фетопротеин) и окончательно дифференцированных (альбумин) гепатоцитов. Эндотелиальные клетки, редко выявляемые методами световой и электронной микроскопии, идентифицировали по экспрессии Flk-1 – рецептора VEGF, а также функциональным тестом – по способности образовывать капилляроподобные структуры в культуре в присутствии ростовых факторов. Клетки-предшественники мезенхимального ростка удалось охарактеризовать только после субкультивирования. По фенотипу, способности к колониеобразованию и мультилинейной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях эти клетки были отнесены к МСК. Причем клетки со схожими свойствами нами были изолированы не только из печени, но и из других фетальных тканей эктодермального [8] и мезодермального происхождения.

Существует два принципиально разных подхода к криоконсервированию биологических объектов: общепринятый, основанный на предотвращении внутриклеточной кристаллизации воды за счет использования относительно низких скоростей охлаждения и концентраций криопротекторов, и витрификация, позволяющая полностью исключить кристаллообразование введением в среду высоких концентраций криопротекторов. Свойства суспензий клеток фетального происхождения могут проявляться в особенностях их реакции на действие различных факторов, в том числе и факторов криоконсервирования. Высокая онтогенетическая и гистогенетическая гетерогенность фетальных клеток определяет две стратегии их криоконсервирования: тотальную и селективную. Тотальная стра-

тегия криоконсервирования направлена на сохранение всех клеток дезагрегированной ткани. Поскольку до настоящего времени, с одной стороны, не идентифицированы все высокопотентные клеточные элементы и трофические факторы фетальных тканей, а с другой – не полностью определены направления их применения, эта стратегия криоконсервирования должна быть доминирующей.

Селективная стратегия направлена на сохранение в результате криоконсервирования одного или нескольких типов клеток с близкими биофизическими свойствами. Например, в наших исследованиях показано, что основная часть клеток гемопоэтического ростка, включая претендентов на СК и КП, сохраняется после применения общепринятых протоколов криоконсервирования, включающих медленное двухступенчатое замораживание под защитой проникающего криопротектора ДМСО. В то же время другие типы клеток сразу после процедуры выделения более восприимчивы к факторам криоповреждения – МСК в составе свежевыделенной суспензии клеток ФПЧ чувствительны к переохлаждению и требуют использования инициации кристаллообразования в ходе охлаждения. Таким образом, применение методов криоконсервирования, исключающих инициацию образования кристаллов льда, позволяет в большей степени сохранить кроветворные клетки и получить после замораживания-отогрева суспензию, обогащенную одной популяцией клеток за счет элиминации другой. Криобиологические подходы, основанные на селективной стратегии криоконсервирования, могут явиться основой для выделения клеток с заданными свойствами и их применения при разработке новых методов лечения конкретных заболеваний.

Перспектива клинического применения фетальных клеток предполагает некоторые особые требования к технологии криоконсервирования. В первую очередь, необходимо максимально снизить концентрацию проникающих криопротекторов, токсичных для клеток, и исключить ксеногенную сыворотку из криозащитной среды. Оба эти ограничения можно преодолеть, введя в состав среды криоконсервирования непроникающие соединения, среди которых наиболее эффективными в наших исследованиях оказались сахароза и высокомолекулярные полиэтиленоксиды.

Заслуживающим особого внимания при разработке технологий криоконсервирования суспензий фетальных клеток следует считать этап подготовки, проведение которого может способствовать снижению повреждающего действия факторов криоконсервирования. Так, в наших исследованиях показано, что краткосрочное культивирование нейральных клеток в виде агрегатов до замораживания способствует их выживаемости после криоконсервирования. Аналогично селективное субкультивирование МСК придает им некоторую устойчивость к переохлаждению, что позволяет эффективно криоконсервировать эти клетки без применения сидинга.

Сравнительное изучение эффективности криоконсервирования с использованием общепринятого метода и витрификации показывает, что более высокие показатели жизнеспособности пока удается получить с помощью традиционных подходов, включающих ступенчатое замораживание в присутствии 10% ДМСО и ЭС. Однако, учитывая перспективность витрификации для сохранения клеток в составе сложных структур, в частности биоинженерных конструкций, этот подход к криоконсервированию требует дальнейших глубоких исследований. Разработка новых и усовершенствование общепринятых подходов криоконсервирования, основанных на фундаментальных исследованиях, обеспечит сохранение всего разнообразия клеточных элементов фетальных тканей.

Литература

1. Абдулкадыров К.М., Балашова В.А. Клеточный состав печени и селезенки в фетальном периоде // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №1. – С. 46–48.
2. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков И.А. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. – Киев: Наук. думка, 1988. – 192 с.
3. Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Волкова Н.А., Скоробогатова Н.Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток–предшественников из эмбриональной печени человека в условиях in vitro // Доповіді НАН України. – 2005. – №2. – С. 138–141.
4. Грищенко В.І., Петренко О.Ю., Снурніков О.С. Трансплантація кріоконсервованих клітинних суспензій ембріонів і плодів людини // Трансплантологія. – 2000. – Т. 1, №1. – С. 137–138.
5. Ляшенко Т.Д., Сукач О.М. Характеристика ізольованих нервових клітин новонароджених щурів // Патологія. –2009. – Т. 6, №1. – С. 55–58.
6. Сукач А.Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология. – 2005.– Т. 47, №3.– С. 207–213.

7. Труфанова Н.А., Петренко Ю.А., Петренко А.Ю. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальних клеток ранних стадий органогенеза // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 2. – С. 135 – 144.
8. Пат. 52266 Україна, МПК A61K 35/54. Спосіб одержання мезенхімальних стовбурових клітин / Ю.О. Петренко; заявник і патентовласник Ін-т проблем кріобіол. і кріомед. НАН України. – №201000019, заявл. 11.01.2010, опубл. 25.08.2010. – Бюл. №16.
9. Ashman L.K., Cambareri A.C., To L.B. et al. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit protooncogene product) in normal human bone marrow // Blood. – 1991. – Vol. 78, № 1. – P. 30–37.
10. Blackall D.P., Armstrong J.K., Meiselman H.J., Fisher T.C. Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycophorin A-specific antibodies and are impervious to invasion by the falciparum malaria parasite // Blood. – 2001. – Vol. 97, №2. – P. 551–556.
11. Boutron P., Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol // Cryobiology. – 1979. – Vol. 16, №1. – P. 83–89.
12. Boutron P., Kaufmann A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol // Cryobiology. – 1979. – Vol. 16, №6. – P. 557–568.
13. Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Experimental Hematology. – 2009. – Vol. 37, №5. – P. 629–640.
14. Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C. et. al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells // J. Immunol. – 1984. – Vol. 133, №1.– P. 157–165.
15. Basic cell culture. A practical approach / Ed. by Davis J.M. – Oxford: Oxford University Press, 2002. – 382 p.
16. De Graaf I.A.M., Draaisma A., Schoeman O. et al. Cryopreservation of rat precisioncut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification // Cryobiology. – 2007. – Vol. 54, №1. – P. 1–12.
17. Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A. et al. Vitrifications as an approach to cryopreservation // Cryobiology. – 1984.– Vol. 21, №4. – P. 407–426.
18. Gallacher L., Murdoch B., Wu D.M., et al. Isolation and characterization of human CD34(–)Lin(–) and CD34(+)Lin(–) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 // Blood. – 2000. – Vol. 95, №9. – P. 2813–2820.
19. Gao D.Y., Chang Q., Farris K., et al. Fundamental cryobiology of human hematopoietic progenitor cells. I: Osmotic characteristics and volume distribution // Cryobiology. – 1998. – Vol. 36, №1. – P. 40–48.
20. Guillot P.V., Gotherstrom C., Chan J. et al. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, № 3. – P. 646–654.
21. Harris M.J., Martin N.E., Modi M., Modi M. Pegylation. A novel process for modifying pharmacokinetics // Clin. Pharmacokinet. – 2001. – Vol. 40, №7. – P. 539–551.
22. Healy L., May G., Gale K. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, №26. – P. 12240–12244.
23. Herskovits T.T., Gadegbeku B., Jaillet H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols // J. Biol. Chem. – 1970. – Vol. 245, №17. – P. 2588–2598.
24. Isachenko E., Isachenko V., Rahimi G. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2003. – Vol. 108, №2. – P. 186–193.
25. Kuleshova L. L., MacFarlane D. R., Trounson A. O. et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol–based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes // Cryobiology. – 1999 – Vol. 38, №2. – P. 119–130.
26. Liu B.L., McGrath J., McCabe L. et al. Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes // Cell Preservation Technology. – 2002. – Vol. 1, №1. – P. 33–44.

27. Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Saugetiere // Folia Haematologica. – 1909. – Vol. 8, № 1. – P. 125–134.
28. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M. et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // Dev. Cell. – 2004. – Vol. 6, №4. – P. 483–495.
29. Miyamoto H., Ishibashi T. Survival of frozen–thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol // J. Reprod. Fertil. – 1977. – Vol. 50, №2. – P. 373–375.
30. Muench M.O., Cupp J., Polakoff J., Roncarolo M.G. Expression of CD33, CD38 and HLA-DR on human fetal liver progenitors with a high proliferative potential // Blood. – 1994. – Vol. 83, №11. – P. 3170–3181.
31. O'Donoghue K., Fisk N. Fetal stem cells // Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. – 2004. – Vol. 18, №6. – P. 853–875.
32. Oguro M., Koizumi F., Sasagawa S. Blood cells in the peripheral blood and hematopoetic organs of the human fetus during hepatic hematopoiesis // Acta Haematol. – 1978. – Vol. 41, №6. – P. 1231–1241.
33. Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B. et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22, №3. – P. 377–384.
34. Petrenko Yu.A., Gorokhova N.A., Tkachova E.N., Petrenko A.Yu. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // Ukrainian Biochemical Journal. – 2005. – Vol. 77, №5. – P. 100–105.
35. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Anal. Biochem. – 1991. – Vol. 194, №2. – P. 326–329.
36. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284, №5411. – P. 143–147.
37. Pontvert-Deluc S., Breton-Gorius J., Schmitt C. Characterization and functional analysis of adult human bone marrow subsets in relation to B-lymphoid development // Blood. – 1993. – Vol. 82, №2. – P. 417–429.
38. Sieff C., Tsai S., Faller D. Interleukin 1 induces cultured human endothelial cell production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor // J. Clin. Invest. – 1987. – Vol. 79, №1.– P. 48–51.
39. Skorobogatova N.G., Novikov A.N., Fuller B.J., Petrenko A.Yu. Importance of a three-stage cooling regime and induced ice nucleation during cryopreservation on colony-forming potential and differentiation in mesenchymal stem/progenitor cells from human fetal liver // CryoLetters. – 2010. – Vol. 31, №5. – P. 371–379.
40. Song Y.C., Chen Z.Z., Mukherjee N. et al. Vitrification of tissue engineered pancreatic substitute // Transplant. Proc. – 2005. – Vol. 37, №1. – P. 253–255.
41. Takahashi T., Hirsh A., Erbe E.F. et al. Vitrification of human monocytes // Cryobiology. – 1986. – Vol. 23, № 2. – P. 103–115.
42. Tarasov A.I., Petrenko A.Y., Jones D.R. The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, №3. – P.333–340.
43. Tarasov A.I., Petrenko A.Y., Jones D.R.E., Grischenko V.I. Phenotypic analysis and colony-forming activity of cryopreserved hematopoietic cells in human fetal liver // Exp.Oncology. – 2002. – Vol. 24. – P. 180–183.
44. Todorov P., Hristova E., Konakchieva R. et al. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver // Cell Biol. Int. – 2010. – Vol. 34, №5. – P. 455–462.
45. Wang H.-Y., Lun Zh.-R., Lu Sh.-Sh. Cryopreservation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells without dimethyl sulfoxide // CryoLetters. – 2011. – Vol. 32, №1. – P. 81–88.
46. Woods E.J., Liu J., Derrow C.W. et al. Osmometric and permeability characteristics of human placental/umbilical cord blood CD34+ cells and their application to cryopreservation // J. Hematother. Stem Cell Res. – 2000.–Vol. 9, №2. – P. 161–173.
47. Wusteman M.C., Pegg D.E., Robinson M.P. et al. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties // Cryobiology. – 2002. – Vol. 44, №1. – P. 24–37.

48. Wusteman M., Pegg D., Wang L.H. et al. Vitrification of ECV304 cell suspensions using solutions containing propane–1,2–diol and trehalose // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, №2. – P. 135–145.
49. Yamashita J., Itoh H., Hirashima M. et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors // Nature. – 2000. – Vol. 408, №6808. – P. 92–96.
50. Yang P., Hua T., Wu J. et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling // CryoLetters. – 2006. – Vol. 27, №6. – P. 361–368.
51. Yokota Y., Sato S., Yokota M. et al. Successful pregnancy following blastocysts vitrification // Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 15, №8. – P. 1802–1803.
52. Yoshino J., Kojima T., Shimizu M. et al. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification // Cryobiology. – 1993. – Vol. 30, №4. – P. 413–422.

Криоконсервирование эмбрионов, репродуктивных клеток и тканей человека и животных

В.И. Грищенко, Е.Ф. Копейка, Н.Н. Чуб,
М.П. Петрушко, В.И. Пиняев, М.И. Крамар

Отдел криобиологии системы репродукции
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
электронная почта: ekopeik@yahoo.com

Криоконсервирование является одним из важнейших методов сохранения генофонда редких и исчезающих видов фауны и флоры, высокопродуктивных домашних животных и ценных пород рыб [72]. В настоящее время в клинической практике успешно применяются хранившиеся при низких температурах эмбрионы, гаметы, овариальная и тестикулярная ткань человека для лечения эндокринопатий различного генеза и некоторых форм бесплодия [22]. Однако, несмотря на значительный прогресс в криоконсервировании половых продуктов человека и животных, исследования процессов, лежащих в основе закономерностей криоповреждения и криозащиты репродуктивных клеток и тканей, все еще остаются актуальными.

В 70–80-е годы прошлого столетия отмечался значительный интерес к криоконсервированию спермы животных. Благодаря фундаментальным исследованиям, были разработаны методы и технологии криоконсервирования спермы животных, которые в последующем использовались при работе со спермой рыб [26].

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 337–360.
© В.И. Грищенко, Е.Ф. Копейка, М.П. Петрушко и др., 2012

Криоконсервирование спермы рыб

Первые успешные работы по криоконсервированию спермы рыб были опубликованы Blaxter J. H. S. [42]. Кусочки молок сельди *Clupea harengus harengus* весеннего нереста замораживали в смеси морской и дистиллированной воды (4:1) с 12,5 % глицерина. Через 6 месяцев хранения при низких температурах они осеменили в среднем 82,5% икры. Успешной была и работа по сохранению спермы другого вида рыб атлантической трески *Gadus morhua* [59], нерестящейся в соленой воде. После ее замораживания в растворе, содержащем NaCl, $NaHCO_3$, глицин и глицерин, размороженная сперма осеменила 45% икры относительно контроля.

Более чувствительными к экстремальным факторам криоконсервирования оказались сперматозоиды пресноводных рыб. Поэтому успешные работы по замораживанию их спермы появились на 15–30 лет позже. Много исследований было выполнено с гаметами лососевых, прежде чем A.G. Ott и H.F. Horton [62] разработали криозащитную солевую среду с 12,5% диметилсульфоксида (ДМСО), которой разбавляли сперму радужной форели *Salmo gairdneri* и замораживали ее над поверхностью жидкого азота со скоростью 30 град/мин. Размороженная сперма осеменила 56% икры.

В 1976 году в ИПКиК НАН Украины был разработан способ криоконсервирования спермы осетровых [17], в соответствии с которым ее разбавляли криозащитной средой, содержащей 0,1 М трис-HC1-буфера (pH 8,1), 10% желтка куриного яйца, 25% ДМСО и замораживали в 1 мл ампулах в парах азота со скоростью охлаждения 5 град/мин от 5 до –15°С, а затем со скоростью 20 град/мин до –196°С. При осеменении размороженной спермой севрюги *Acipenser stellatus* от 100 до 200 г икры среднее оплодотворение составляло 55%, а у стерляди *Acipenser ruthenus* – от 57 до 85%.

В 1979–1980 гг. сотрудниками нашего отдела совместно с сотрудниками Ин-

Используемые сокращения
IVF – in vitro fertilization, экстракорпоральное оплодотворение
ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
ДМСО – диметилсульфоксид
КГК – клетки гранулезы и кумулюса
ПЭО-400 – полиэтиленоксид с молекулярной массой 400.

ститута гидробиологии АН УССР был разработан способ криоконсервирования спермы карпов *Cyprinus carpio*, который позволил получать до 64% оплодотворенной икры при 83% в контроле (свежая сперма) [14]. По причине высокой смертности эмбрионов нами был разработан новый способ [16], который мы совместно с сотрудниками Всесоюзного НИИ прудового рыбного хозяйства использовали при создании первого в СССР криобанка спермы карпов (п. Рыбное, Московская область) [18]. Криоконсервированный материал частично дублировался в экспериментальном криобанке ИПКиК НАН Украины. Кроме того, по хоздоговору с Тихоокеанским институтом рыбного хозяйства и океанографии, в Тульской области была заморожена сперма немецкого карпа и проведено осеменение икры сазана на тепловодном хозяйстве Приморской ГРЭС в Хабаровском крае. За один сезон было выращено 7 т товарной рыбы при средней массе гибрида 1250 г (средняя масса в контроле сазан×сазан – 800 г). Использование криоконсервированной спермы позволило исключить транспортировку производителей между отдаленными хозяйствами, снизило вероятность распространения инфекций и повысило эффективность работы рыбоводов. Размороженная сперма сазана после 26 лет хранения в криобанке ИПКиК НАН Украины оплодотворила 74% яйцеклеток карпа, что практически не отличалось от результатов осеменения свежей спермой (карп×карп) в контроле (71%).

Проведенное нами сравнение методов криоконсервирования спермы рыб разных авторов показало высокую вариабельность подвижности размороженной спермы, что, вероятно, можно объяснить различиями в исходном качестве материала. Поэтому наши исследования были сконцентрированы на определении роли окружающей среды в формировании свойств сперматозоидов рыб (в том числе и криорезистентности), а также на изучении механизмов и локализации криоповреждений.

На первом этапе исследований сравнивали криорезистентность и состав фосфолипидов мембран сперматозоидов 10 видов морских и пресноводных рыб [11]. После прямого погружения суспензий клеток в жидкий азот в размороженной сперме активировались от 5 до 10% сперматозоидов только у морских видов рыб. Учи-

тывая, что отношение количества холестерина к общим фосфолипидам в сперме морских видов рыб было в 2,5–3 раза выше, чем у пресноводных, мы предположили, что этим и объясняются различия в криорезистентности сперматозоидов рыб из разных ареалов обитания [11]. Благодаря своим уникальным свойствам холестерин в зависимости от расположения и окружающих его структур может оказывать расжижающее или конденсирующее влияние на мембраны. Он увеличивает устойчивость сперматозоидов солоноводных рыб к осмотическим нагрузкам, возникающим при активации спермы и при криоконсервировании. С увеличением количества холестерина в мембранах повышалась криорезистентность и у сперматозоидов радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [66], а также у сперматозоидов таких млекопитающих, как быки [65] и жеребцы [58].

Некоторые авторы [54] отрицают положительное влияние холестерина на криорезистентность, показывая, что у форели с увеличением его содержания в мембранах сперматозоидов снижается процент оплодотворения. Вероятно, это можно объяснить тем, что в результате воздействия на рыб такого сильного модифицирующего фактора, как повышение температуры, в мембранах сперматозоидов увеличивались количество холестерина и насыщенность жирных кислот. Кроме того, этот фактор привел к значительно большей ошибке, в отличие от авторов [66], которые изменяли концентрацию холестерина в мембранах сперматозоидов варьированием состава питания рыб.

В процессе длительной эволюции сперматозоиды рыб из разных ниш обитания приобрели свойства, соответствующие нише размножения. Сперматозоиды морских рыб адаптировались к высокому осмотическому давлению среды и активируются при повышении осмотичности среды [51], а сперматозоиды пресноводных становятся подвижными при гипотонии. Они не адаптированы к увеличенной осмотичности криозащитных сред и поэтому менее криорезистентны, чем сперматозоиды солоноводных рыб.

Следующей причиной повышения криорезистентности сперматозоидов рыб может быть увеличение продолжительности движения гамет [51], связанного с энергетическим состоянием клетки. У карпов, содержавшихся в условиях гипоксии или гипероксии,

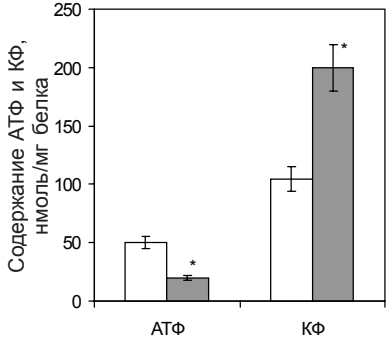


Рис. 1. Содержание АТФ и креатинфосфата (КФ) в размороженной сперме карпов до аэрации (□) и после 20 мин аэрации (■); * – статистически достоверные различия по сравнению с данными до аэрации, $p < 0,05$.

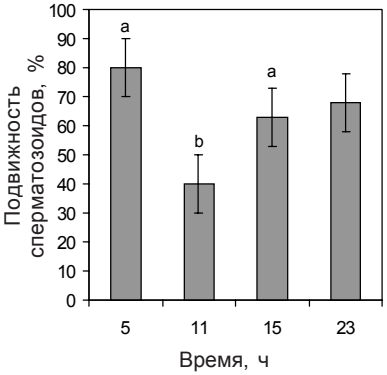


Рис. 2. Влияние времени суток на подвижность сперматозоидов Сибирского осетра *Acipenser baerii*, получаемых через каждые 6 часов в течение нескольких дней после гипофизарной стимуляции; значимость парных различий показана индексами *a*, *b* (тест Дункана, $p < 0,05$)

подвижность сперматозоидов была на 20–30% ниже, чем при нормоксии (5–6 мг/л) [49]. После 20 мин продувки воздуха через размороженную сперму карпа ее оплодотворяющая способность увеличивалась на 20% вследствие переработки АТФ в креатинфосфат (КФ) (рис. 1) [19]. Кроме того, было показано [51, 73], что подвижность сперматозоидов Сибирского осетра зависит от степени зрелости семенников в период гипофизарной стимуляции, а также от частоты и времени получения спермы. При многократном ее получении от тех же особей был обнаружен циркадный ритм дозревания сперматозоидов с максимумом подвижности в 5 ч утра (рис. 2) [73]. На качество и криорезистентность дозревающей спермы рыб существенное влияние оказывала пища, обогащенная белками [51] и ненасыщенными жирными кислотами [66].

При изучении влияния криоконсервирования на геном сперматозоидов рыб [50] было установлено, что гибель диплоидных

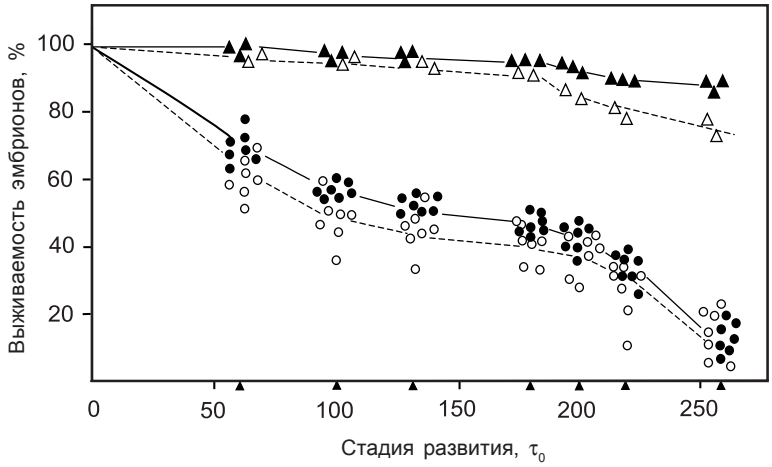


Рис. 3. Выживаемость диплоидных (▲△ – 2n) и андрогенетических гаплоидных эмбрионов(●○ – 1n), полученных после осеменения яйцеклеток карпа *Cyprinus carpio* нативной (▲●) и криоконсервированной спермой (△○).

и гаплоидных андрогенетических эмбрионов карпа, полученных с использованием размороженной спермы, была выше, чем в контроле (рис. 3). Этот факт доказывал вероятность повреждения генома сперматозоидов карпа при криоконсервировании и на нем основывался экспресс-метод оценки повреждений генетического аппарата клеток [50]. Для подтверждения правильности сделанных выводов был заблокирован предполагаемый путь репарации ДНК в яйцеклетках рыб с помощью 3-аминобензамида (рис. 4) [52]. При этом смертность эмбрионов резко возросла, что доказывало возможность повреждений ДНК при криоконсервировании. Кроме того, были обнаружены значимые различия выживаемости эмбрионов между самками, свидетельствующие о разных потенциях яйцеклеток.

Таким образом, из представленных выше результатов, полученных на сперме рыб из разных ареалов обитания, следует, что качество сперматозоидов после криоконсервирования зависит от среды обитания и содержания рыб, состава криозащитной среды,

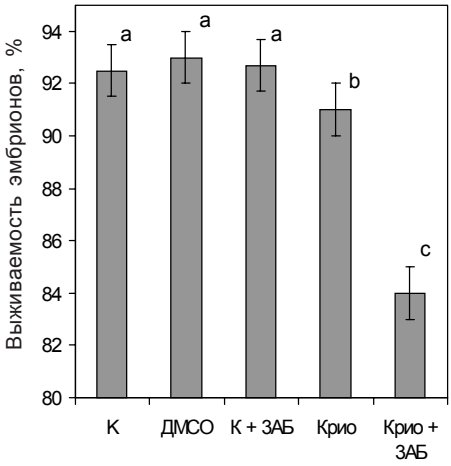


Рис. 4. Выживаемость эмбрионов вьюна *Migurnus fossilis* после 20-й стадии развития: К – контроль (эмбрионы, полученные с использованием свежей спермы); ДМСО – эмбрионы, полученные с использованием спермы, эквилибрированной в растворе с ДМСО; К + ЗАБ – контроль + 3-аминобензамид; Крио – эмбрионы, полученные с использованием размороженной спермы; Крио + ЗАБ – эмбрионы, полученные с использованием размороженной спермы + 3-аминобензамид. Значимость парных различий показана индексами *a*, *b*, *c* (тест Дункана, $p < 0,05$)

выбранного криопротектора, режимов замораживания и размораживания, а также от условий осеменения. Полученные результаты позволили нам обосновать гипотезу о полифакторной природе криорезистентности сперматозоидов рыб и других организмов, разработать методы криоконсервирования спермы, собрать коллекцию и создать криобанки в разных городах Украинв и России.

Криоконсервирование спермы человека

В настоящее время криоконсервирование спермы человека широко используется для сохранения репродуктивной функции пациентов с онкологическими заболеваниями при назначении им химиотерапии [40], вазэктомии [41], при лечении бесплодия, а также для хранения гамет мужчин опасных профессий или донорской спермы.

Еще в 1953 году J.K. Sherman и R.G. Bunge [68] заморозили сперму человека в среде с конечной концентрацией глицерина 10% и получили после отогрева 67% выживаемости спермиев. Хотя сперматозоиды человека – одни из наиболее криоустойчивых клеток, анализ работ показал, что из-за высокой вариабельности

качества спермы после размораживания сохранялось до 50% клеток. Поэтому исследования по разработке новых протоколов криоконсервирования спермы человека продолжались, и к настоящему времени сформировалось два подхода к замораживанию спермы: с медленными скоростями охлаждения (1–170 град/мин) и высокими скоростями (3000–30000 град /мин) – витрификация. Результаты ранних исследований [56] и последних лет [61] свидетельствуют, что метод витрификации эффективен при криоконсервировании мужских гамет. Сверхвысокие скорости охлаждения спермы позволяют сократить время действия повреждающих факторов и длительность процесса охлаждения биообъекта.

Исследовательские работы, проводимые в ИПКиК НАН Украины с 1980 года, были направлены на подбор криозащитных сред и разработку методов криоконсервирования спермы человека, не требующих дорогостоящего оборудования и позволяющих сохранять морфофункциональные характеристики сперматозоидов. Эти исследования выполнялись на эякулятах от здоровых мужчин и на сперме с различными отклонениями от нормы. В результате этих работ были созданы многокомпонентные криозащитные среды, разработаны режимы медленного охлаждения эякулятов, что позволило снизить концентрацию глицерина до 4,5% [37] и сохранить жизнеспособность до 70–80% спермиев [27]. После изучения влияния на сохранность спермиев человека сверхбыстрых скоростей охлаждения [3, 12, 45] был разработан метод витрификации спермы (скорость охлаждения 3000–5000 град/мин) в среде полифункционального криоконсерванта с 0,26 моль/л глицерина. Использование данного метода обеспечивало выживаемость до 90% клеток в размороженной сперме [3, 6, 39]. Сперма с низкой концентрацией клеток и низкой подвижностью хуже переносила процесс замораживания-оттаивания [30]. Для повышения потенций такой спермы нами была проведена серия экспериментальных работ по выяснению влияния различных физико-химических факторов на сперматогенез [34] и качество спермы у пациентов с патозоопермией [31]. Также изучалась возможность улучшения морфофункциональных характеристик спермиев на разных этапах криоконсервирования. С этой целью в среды консервирования или

реабилитации спермы добавляли до и после криоконсервирования производные метилксантинов [24], раствор цитохрома С [1], адреналин [35], перфторан [23], а также биологические жидкости организма человека: спермальную плазму, сыворотку крови [13], фолликулярную и перитонеальную жидкость [20]. В не-которых работах суспензию спермиев подвергали воздействию гипотермии [21], постоянного магнитного поля, лазерного излу-чения [2].

Таким образом, в результате многолетних исследований по изучению влияния криоконсервирования на морфофункциональные свойства спермиев человека при нормо- и патоспермии были разработаны эффективные нетрудоемкие методы криоконсервирования мужских гамет, способы реабилитации спермиев после воздействия низких температур для повышения оплодотворяющей способности размороженной спермы в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). На базе института создан экспериментальный банк различных образцов спермы человека. Результаты наших разработок успешно используются в клинической практике для инсеминации криоконсервированной спермой донора или мужа, а также в программах IVF при лечении бесплодия.

Криоконсервирование преимплантационных эмбрионов человека

В 1989 году в ИПКиК НАН Украины были начаты исследования по разработке и внедрению в клиническую практику метода оплодотворения яйцеклетки человека *in vitro* (IVF). На первом этапе изучали влияние схем стимуляции суперовуляции пациенток, условий и сред культивирования на качество яйцеклеток и эмбрионов. В 1991 году впервые в Украине после успешного проведения сотрудниками института программы IVF родилась девочка, зачатие которой произошло вне организма матери.

На основании наших разработок впервые в Украине была получена беременность после переноса пациентке размороженного эмбриона, находящегося на стадии 4 бластомеров [4].

Известно, что в результате применения индукторов суперовуляции в программе IVF при аспирации фолликулов, как правило,

получают значительное количество ооцитов различной степени зрелости. Усовершенствование эмбриологического этапа в программе IVF увеличило частоту оплодотворения яйцеклеток, благодаря чему появилась возможность получать больше эмбрионов, чем необходимо для эмбриотрансплантации. При переносе больше двух эмбрионов возрастает риск многоплодной беременности. Разработка методов криоконсервирования эмбрионов человека открыла новые возможности в циклах лечения бесплодия методом IVF. В настоящее время оставшиеся эмбрионы криоконсервируют и используют для эмбриопереноса в следующих менструальных циклах без гормональной стимуляции под контролем ультразвукового и гормонального мониторинга.

Первая беременность после переноса деконсервированного эмбриона была получена в 1983 году [57]. Существуют сообщения о получении многоплодных беременностей. Так, в 1995 году впервые после переноса трех криоконсервированных эмбрионов была диагностирована монохориальная триамниотическая беременность, закончившаяся рождением трех здоровых нормальных мальчиков [69], а в 1998 году – пятиплодная беременность [63]. Средняя эффективность метода криоконсервирования определяется по частоте наступления беременности и составляет по данным разных центров от 11 до 37% [47, 71].

В настоящее время не существует универсального метода криоконсервирования эмбрионов человека ввиду различного влияния факторов криоконсервирования на генетический аппарат эмбрионов. Известно несколько подходов к замораживанию эмбрионов, основанных на использовании медленного или быстрого охлаждения и витрификации. Одна из причин повреждения эмбрионов при замораживании и размораживании – образование внутри- и внеклеточных кристаллов льда. Установлено, что разные стадии эмбрионов млекопитающих проявляют неодинаковую криоустойчивость, что предполагает применение различных криопротекторов для сохранения эмбрионов в полноценном состоянии. Было показано [55], что для стадии зиготы оптимальным является добавление в среду эквилибрации раствора 1,5 М 1,2-пропандиола, для стадии 4 бластомеров – раствора 1,5 М этиленгликоля [70]. Для

жизнедеятельности эмбрионов не менее важен процесс отогрева, преимущественно быстрый, поскольку при медленном режиме размораживания эмбрионы погибают вследствие рекристаллизации. Криопротектор удаляют путем последовательного помещения эмбрионов в растворы с уменьшающейся концентрацией.

Наиболее чувствителен к повреждающему действию криоконсервирования цитоскелет ооцитов [67]. Из-за нарушения митотического аппарата у поврежденных клеток резко снижается митотическая активность. Если изменения в клетке незначительны, то может происходить репарация клеточных повреждений, и клетка возвращается к нормальному функциональному состоянию.

В последнее время появилось много публикаций по сохранению эмбрионов человека с использованием методов витрификации [53, 60]. При витрификации не образуются кристаллы льда, так как эмбрионы предварительно эквилибрируют в растворах с высокими концентрациями проникающих (ДМСО, ацетамид, пропиленгликоль) и непроникающих (полиэтиленгликоль, фиколл, сахароза) криопротекторов. После обезвоживания цитоплазмы и насыщения ее криопротекторами эмбрионы в специальных контейнерах погружают в жидкий азот [53, 60]. Существенный недостаток витрификации – токсичность растворов криопротекторов, которая прямо пропорциональна концентрации, продолжительности и температуре экспозиции эмбриона в них. Большие трудности при витрификации возникают и на этапе отогрева, поскольку велик риск рекристаллизации. Во избежание дополнительных разрушений эмбриона необходимо обеспечить его быстрый отогрев с одновременным отмыванием от протекторов.

Дискуссионным остается вопрос относительно оптимальной стадии развития эмбриона, способной перенести условия глубокого охлаждения.

Кариология раннего эмбриогенеза человека изучена достаточно хорошо, однако существуют противоречивые выводы относительно результатов криоконсервирования эмбрионов человека на стадии зиготы. Так, одни авторы рекомендуют криоконсервировать эмбрионы человека именно на этой стадии, демонстрируя эффективность применения низких скоростей охлаждения [70], другие –

считают криоконсервирование эмбрионов на данной стадии бесперспективным [43]. Были продемонстрированы успешные результаты криоконсервирования эмбрионов на стадии кавитированной бластоцисты [63]. Описан случай развития беременности и родов после переноса бластоцисты, замороженной дважды [57]. Однако криоконсервирование бластоцист является более трудной задачей, чем криоконсервирование эмбрионов на стадии дробления. Предполагают, что трофэктодерма, как эпителиальный слой эмбриона, препятствует проникновению криопротекторов в полость и клетки бластоцисты. В пользу этого свидетельствует тот факт, что механический прокол трофобласта повышает эффективность криокон-сервирования бластоцист. Поздние стадии развития эмбрионов легче переносят условия криоконсервирования, поскольку объем клетки не увеличивается, происходит компактизация бластомеров и, если один или несколько бластомеров были повреждены, то остальные все же могут дать начало развитию целого организма. Однако необходим тщательный анализ сохранности бластомеров, целостности мембраны и *zona pellucida*.

Остается дискуссионным вопрос криоконсервирования эмбрионов человека, полученных после цитоплазматической инъекции спермия в ооцит. Прокол *zona pellucida* при проведении данной процедуры увеличивает проницаемость мембраны эмбриона и усложняет процедуру насыщения криопротектором и дегидратации. Проблематичным остается криоконсервирование эмбрионов человека, перенесших биопсию полярных телец либо бластомеров для преимплантационной генетической диагностики.

Таким образом, на сегодняшний день существует несколько направлений криоконсервирования преимплантационных эмбрионов человека. Прежде всего они основаны на использовании разных скоростей охлаждения и состава криоконсерванта. Вспомогательные репродуктивные технологии требуют постоянного совершенствования процедуры криоконсервирования, которая позволит не только получить высокую выживаемость клеток, но и обеспечит генетическую полноценность эмбрионов человека, поскольку факторы криоконсервирования могут затрагивать различные уровни биологической организации.

Следует отметить, что использование криоконсервированных эмбрионов сокращает число врачебных манипуляций, время пребывания пациентов в лечебном учереждении, уменьшает стоимость программы IVF и необходимо в последующих циклах при гиперстимуляции яичников или незрелости эндометрия. Кроме того, это также открывает новые возможности для донорства эмбрионов и суррогатного материнства.Сотрудники ИПКиК НАН Украины изучают влияние факторов криоконсервирования на генетический аппарат преимплантационных эмбрионов человека; разрабатывают научно обоснованные принципы комплексной оценки эмбрионов, учитывающие морфологические характеристики, стадию клеточного цикла, способность к возобновлению митоза, скорость морфогенетических процессов и результаты преимплантационной генетической диагностики для успешного использования замороженно-оттаянных эмбрионов в ВРТ при лечении бесплодия [5, 28].

Криоконсервирование и имплантация клеток и ткани яичника

Во всем мире проводятся исследования по изучению механизмов регуляции репродуктивной функции женщины, результаты которых позволили выявить основные закономерности роста фолликулов, процесса овуляции и образования желтого тела, охарактеризовать особенности влияния на них гонадотропных гормонов. Известно, что репродуктивные и эндокринные нарушения функции яичников могут быть связаны как с генетическими факторами, так и с влиянием окружающей среды, стресса, инфекцинных заболеваний и пр. Как правило, схемы лечения овариальной дисфункции основаны на медикаментозной, физиотерапевтической и гормонозаместительной терапии. Однако в тех случаях, когда пациенты по разным причинам (длительные курсы лечения, побочные реакции на гормоны, высокую стоимость лекарств и пр.) не могут принимать гормональные и лекарственные препараты, используют ВРТ или немедикаментозные методы лечения, в частности стремительно развивающиеся клеточно-тканевые технологии. В этой связи одной из основных стратегий сохранения репродуктивного

и эндокринного здоровья женщины является трансплантация клеток и ткани яичника.

Основателем исследований по пересадке яичников в клинике считают Роберта Моррисона (1895 г.). В России подобные операции в эксперименте проводили В.Г. Григорьев (1897 г.), П.П. Сидоров (1927 г.), основными задачами которых были восстановление гормональных нарушений и омоложение. В настоящее время пересадку яичника используют для восстановления гормональной и репродуктивной функции при таких патологических состояниях, как ревматоидный артрит, серповидная клеточная анемия, эндометриоз, овариальные кисты, болезнь Ходжкина.

Яичники хорошо подходят для подсадок, так как имеют избыточное количество примордиальных фолликулов и могут реваскуляризироваться. Однако в ранних исследованиях не было получено клинических результатов из-за иммунной реакции организма реципиента на трансплантат и отсутствия долгосрочных методов хранения яичников человека.

Криоконсервирование овариальной ткани и длительное хранение при низких температурах имеют ряд преимуществ перед замораживанием ооцитов и эмбрионов. Во-первых, зрелые ооциты могут быть получены только в определенное время и, как правило, в стимулированном менструальном цикле, так как в естественном цикле их количество ограничено. Во-вторых, несмотря на существенный прогресс, достигнутый при замораживании яйцеклеток [53, 57], существует предположение, что охлаждение ооцита может вызывать хромосомные аномалии [64]. Многолетние исследования по криоконсервированию эмбрионов доказали эффективность данного метода [63], однако для получения полноценных эмбрионов необходимо оплодотворение зрелых яйцеклеток, в то время как из размороженной овариальной ткани или гонад можно получать яйцеклетки путем дозревания их *in vitro* или *in vivo* при трансплантации в организм реципиента.

В настоящее время во многих странах мира проводятся широкие клинические и экспериментальные исследования по восстановлению репродуктивной функции у человека и животных с помощью трансплантации криоконсервированной овариальной ткани [44, 48].

Исследования по криоконсервированию и хранению овариальной ткани животных и человека были начаты в ИПКиК НАНУ в конце 80-х годов. Экспериментальные работы показали [25], что после криоконсервирования яичников под защитой полиэтиленоксида молекулярной массы 400 (ПЭО-400) и последующей подсадки у крыс восстановилась гонадная функция. В этот же период совместно с кафедрой акушерства и гинекологии Харьковского государственного медицинского университета начались исследования возможности криоконсервирования ткани яичника человека. Были использованы фрагменты овариальной ткани, полученные у женщин в возрасте от 20 до 50 лет, оперированных по поводу миомы матки. Яичники фрагментировали (1×1×5×7 мм), чтобы минимизировать гипоксию и улучшить насыщение криопротектором центрального фрагмента кусочка, помещали в криозащитную среду и после 30 мин экспозиции криоконсервировали с использованием нескольких программ замораживания [33]. Образцы охлаждали на программном замораживателе ЗП-10 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Криоконсервированию подвергались фрагменты стромы, теки-гранулезы и желтого тела, однако полного разделения клеток не происходило. После размораживания эксплантаты сохраняли жизнеспособность и секретировали *in vitro* стероидные гормоны – эстрадиол и прогестерон. Необходимо отметить, что лаг-период при культивировании данных образцов увеличивался до 2–3 суток по сравнению с нативной культурой [33]. Считается, что строма яичника наиболее устойчива к различным физико-химическим факторам [46]. В наших исследованиях не было обнаружено значительных изменений в морфофункциональном состоянии различных клеток яичника после действия низких температур.

В результате проведенных нами исследований (1981–1990 гг.) был разработан метод криоконсервирования овариальной ткани человека под защитой 10%-го раствора ПЭО-400 [36] и на базе ИПКиК НАН Украины был создан низкотемпературный банк криоконсервированных ауто- и аллогенных клеток и ткани яичника для долгосрочного хранения и последующего применения в клинической практике при эндокринопатиях различного генеза. При подсадке овариальной ткани учитывали патофизиологическое

состояние пациентки с целью подбора соответствующего графта. Для снижения иммунного конфликта аллогенные криоконсервированные образцы овариальной ткани имплантировали в «мешочек» из амниотической оболочки [8]. Однако необходимо отметить, что что при имплантации несосудистых нативных и криоконсервированных графтов до их реваскуляризации возникает достаточно длительная ишемия, которая может приводить к значительному повреждению ткани.

В результате ретроспективного наблюдения (в течение 20 лет) была доказана эффективность аллотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани при лечении аменореи [7], гипоменструального, климактерического и посткастрационного синдромов [29], а также как метода коррекции эндокринного бесплодия [32], синдрома «тестикулярной феминизации» [9].

В настоящее время в ИПКиК НАН Украины проводятся исследования по изучению влияния низких температур на клетки гранулезы и кумулюса (КГК) яичника человека, которые получают при проведении программы IVF. Как указывалось выше, ранее функцию фолликулярных клеток яичника, как правило, исследовали в комплексе с клетками теки и стромы, выделенных из фолликулов разной степени зрелости. При аспирации преовуляторных фолликулов в программе IVF вместе с ооцитами в фолликулярной жидкости находятся фрагменты фолликулярного эпителия (клетки гранулезы) и кумулюс. При выделении КГК представляют собой немногослойные слегка полярисцирующие фрагменты фолликулоцитов размером 0,3×0,5 мм. Фолликулярные клетки богаты органеллами и содержат многочисленные пиноцитозные пузырьки, участвующие в продукции фолликулярной жидкости и стероидных гормонов.

В результате исследования впервые были получены данные о способности КГК к росту и развитию в культуре после хранения в условиях гипотермии (4°С) и сверхнизких температур [10]. В тканевой погруженной культуре нативные и криоконсервированные КГК имели круглое или овальное ядро, расположенное иногда эксцентрично, цитоплазму, содержащую гранулы, специфичные для данного вида клеток. Клетки мигрировали из основного фрагмента

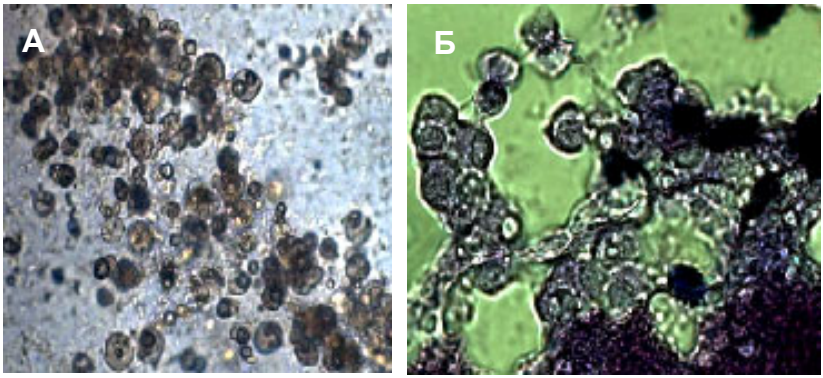


Рис. 5. Культивирование клеток гранулезы и кумулюса (10-е сутки), криоконсервированных с использованием трехэтапной программы замораживания. Миграция клеток из фрагмента (А), образование агрегатов (Б), ×240 (А), ×480 (Б).

по дну планшета (рис. 5, А). В некоторых препаратах появлялись эпителиоподобные клетки с микрофиламентами (актиноподобные фибриллы, способные к сократительной функции), которые разрастаясь, ограничивали полости различной величины, приобретая органотипический характер роста (рис. 5, Б). При изучении жизнеспособности КГК с помощью флуоресцентного зонда пропидиум йодида было обнаружено, что после криоконсервирования количество поврежденных КГК увеличивается на 25%. Исследование стероидогенной активности с помощью флуоресцентного красителя нильского красного (НК) показало, что после экспозиции с криозащитной средой (5% ДМСО + 5% ПЭО-400) и криоконсервирования около 60–70% КГК имели яркую флуоресценцию с выраженной зернистостью в цитоплазме (рис. 6, А, Б), что опосредованно свидетельствует о гормонопродуцирующей способности клеток.

Криоконсервированные КГК яичника человека успешно использовали при сокультивировании с эмбрионами человека для дозревания их до стадии бластоцисты с целью повышения результативности эмбриотрансплантации в программе IVF [38].

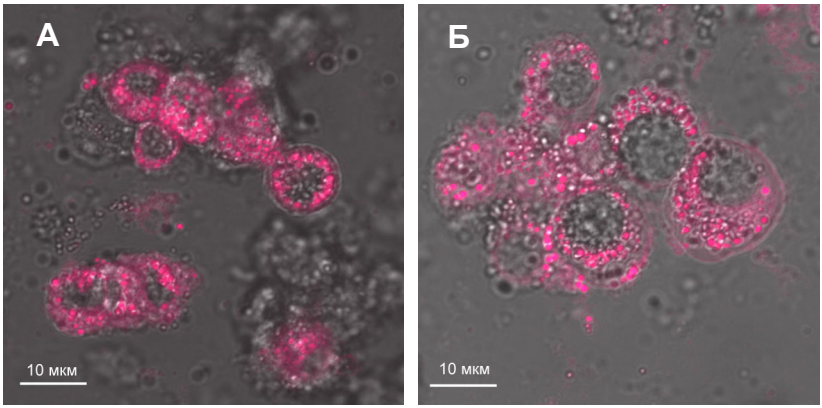


Рис. 6. Флуоресценция клеток гранулезы и кумулюса: после добавления криозащитной среды (А); после криоконсервирования с использованием трехэтапной программы замораживания (Б); конфокальная микроскопия, окраска нильским красным.

Имплантированные овариоэктомированным крысам КГК, хранившиеся в условиях гипотермии, сохраняли специфическую структуру ткани, клетки имели мелко-зернистую базофильную цитоплазму, с небольшим овальным ядром (рис. 7). Из имплантата за счет межклеточных контактов происходило формирование фолликулоподобной структуры. Однако в случае замороженных-отогретых КГК на гистологических срезах наблюдались значительные признаки дегенеративных изменений. По-видимому, развитие данных морфологических образований инициируется эндогенными факторами (животным не удаляли гипоталамо-гипофизарный комплекс). Кроме того, имплантаты КГК под влиянием гонадотропных гормонов и паракринных факторов восстанавливали синтез стероидных гормонов. Уровень эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови животных-реципиентов был статистически достоверно выше, чем у овариоэктомированных крыс без имплантации КГК, однако значительно снижался по отношению к интактному контролю [15].

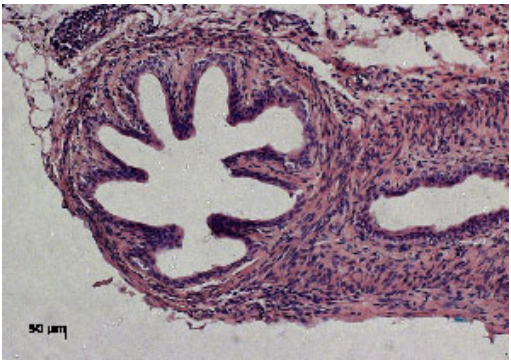


Рис. 7. Клетки гранулезы и кумулюса яичников человека на 10-е сутки после имплантации овариэктомированным крысам; окраска гематоксилином-эозином.

Таким образом, установлено, что после действия низких температур КГК сохраняли морфологические характеристики и значительный стероидогенный потенциал *in vivo* и *in vitro*. Был разработан технологически нетрудоемкий и эффективный способ замораживания и длительного хранения КГК, который обеспечивает высокую сохранность их биологических свойств. Экспериментально установленный факт эффективности имплантации криоконсервированных КГК при развитии гормонодефицита у овариэктомированных крыс является обоснованием для их потенциального применения в клинической практике как метода немедикаментозного лечения пациентов с эндокринопатиями различного генеза. Кроме того, долгосрочное хранение при –196°С позволяет проводить тщательное гистологическое, бактериологическое и вирусологическое обследование образцов и использовать их в клинике в удобное для пациентов и врачей время.

Проведенные фундаментальные исследования по выяснению механизмов криоповреждений и факторов, влияющих на свойства и выживаемость криоконсервированных клеток, эмбрионов и репродуктивных тканей животных и человека позволили объяснить механизм формирования криорезистентности клеток и легли в основу разработанных нами способов криоконсервирования, кото-

рые используются в аквакультуре и находят широкое применение в медицине. Использование криоконсервированной спермы позволило восстановить исчезнувшую линию карпа, значительно сократить сроки получения товарной рыбы, показало возможность использования в производственных условиях. В созданные криобанки заложен бесценный материал, который даст возможность селекционерам вывести новые высокопродуктивные породы рыб. В криобанке хранится сперма исчезнувшего вида осетровых – Аральского шипа, использование которой в будущем позволит восстановить этот вид. Криоконсервированная сперма, эмбрионы и репродуктивные ткани человека успешно применяются в клинической практике. Эффективность созданных нами криобанков репродуктивных клеток в будущем может быть значительно повышена при использования собранных коллекций специалистами из разных областей науки и технологии. Продолжение начатых нами исследований по витрификации эмбрионов позволит в будущем разработать способы криоконсервирования новых биологических объектов, необходимых для человека, и значительно расширит возможности медиков при лечении многих заболеваний.

Литература

1. Алексеевская Э.И., Крамар М.И., Чуб Н.Н. Влияние цитохрома С на подвижность и фертильность спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии и при –196°С // Проблемы криобиологии. – 2002. – №2. – С. 59–61.
2. Весич Т.Л., Крамар М.И. Изучение действия лазерного облучения на нативные и перенесшие криоконсервирование спермии человека // Проблемы криобиологии. – 1994. – №2. – С. 55–57.
3. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. Сверхбыстрые скорости и витрифицирующие растворы в криобиологии // Проблемы криобиологии. – 1993. – №3. – С. 3–14.
4. Грищенко В.И., Петрушко М.П. Геродес А.Г., Терпячая И.В. Беременность и роды после трансплантации деконсервированных эмбрионов человека // Проблемы криобиологии. – 2003. – №3. – С. 99–102.
5. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Ерогова Н.Н. Генетический анализ нативных и криоконсервированных эмбрионов человека // Проблемы репродукции. – 2003. – №6. – С. 50.
6. Грищенко В.И., Чадаев В.Е., Кучков И.Н., Черкашина И.В. Функциональные и биохимические характеристики спермиев человека при криоконсервировании в условиях сверхбыстрого охлаждения // Сексология и андрология. – К.: 2002. – Вып. 6. – С. 256.
7. Демина Л.Г., Лобынцева Г.С., Чуб Н.Н. Отдаленные результаты немедикаментозного лечения генетически детерминированных аменорей // Актуальные вопросы физиологии и патологии репродуктивной функции женщины. – Харьков, 1989. – С. 63–65.

8. Дьоміна Л.Г., Прокопюк О.С., Чадаєв В.Є. та ін. Методика імплантації кріоконсервованих фолікулярних клітин фрагментів яєчника людини при лікуванні овариальної гіпофункції // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. – 2011. – Т. 147, №2. – С. 140–142.
9. Демина Л.Г., Титаренко Л.Е., Гришина О.А. и др. Перспективы нового подхода к лечению некоторых интерсексуальных состояний // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. – 2008. – Т. 144, №1. – С. 37–38.
10. Добрунова И.В., Чуб Н.Н., Петрушко М.П. Культивирование клеток гранулезы и кумулюса после гипотермического хранения // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 98–100.
11. Дрокин С.И., Копейка Е.Ф., Грищенко В.И. Различия в устойчивости к криоконсервированию и специфика липидных составов сперматозоидов морских и пресноводных видов рыб // ДАН СССР. –1989. – Т. 304, №6. – С. 1493–1496.
12. Дунаєвська А.В. Вплив високих швидкостей охолодження на морфофункціональні властивості спермій людини при нормо- та олігоастеноспермії: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, 2001. – 19 с.
13. Дунаевская А.В. Влияние спермальной плазмы, кордовой сыворотки и сыворотки крови человека в среде криоконсервирования на сохранность криоконсервированных спермиев // Проблемы криобиологии. – 2000. – №3. – С. 44–50.
14. Жукинский В.Н., Копейка Е.Ф., Недялков Г.Ф. Криоконсервация спермы рыб и опыт ее использования для получения потомсства карпа // Гидробиол. журнал. – 1981. – Т. XVII, Вып. 6. – С. 39–52.
15. Кирошка В.В., Чуб Н.Н., Тищенко Ю.О. и др. Морфофункциональные характеристики клеток гранулезы и кумулюса яичника человека, имплантированных овариоэктомированным крысам // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. – 2009. – Т. 145, №2. – С. 150–152.
16. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературному консервированию спермы карпа. – М., Рыбное: ВНПО по рыбоводству, 1986. – 11 с.
17. Копейка Е.Ф., Новиков А.Н. Криоконсервирование спермы рыб // Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1983. – С. 204–215.
18. Копейка Е.Ф., Цветкова Л.И., Катасонов В.Я. и др. Формирование коллекции низкотемпературного банка спермы карпа // Вопросы селекции, генетики и племенного дела: Сб. научн. трудов. – 1989. – №58. – С. 66–68.
19. Копейка Е.Ф., Черепанов В.В., Дзюба Б.Б. Анализ содержания АТФ и креатинфосфата в сперме карпа (*Cyprinus carpio*) до и после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 1997. – №4. – С. 41–45.
20. Крамар М.И, Юрченко Г.Г., Чуб Н.Н. и др, Применение фолликулярной и перитонеальной жидкостей для выделения подвижной фракции спермиев при олигоастеноспермии // Сексология и андрология. – 2000. – №5. – С. 80–81.
21. Крамар М.И. Влияние гипотермии на морфологические и функциональные характеристики спермиев человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1990. – 40 с.
22. Криобиология и проблема бесплодия / Под ред. В.И Грищенко, Ю.С. Паращука, Ф.В. Дахно, Г.Г. Юрченко. – К.: Наук. думка, 1990. – 135 с.
23. Кучков И.Н., Черкашина И.В. Использование перфторированных углеводородов для низкотемпературного хранения спермиев человека // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №4. – С. 515–520.
24. Лучко Н.А., Кучков И.Н. Влияние кофеина и пентоксиллина на гликолитическую функцию спермиев человека, криоконсервированных в условиях сверхбыстрых скоростей охлаждения // Проблемы криобиологии. – 1999. – №4. – С. 8–13.
25. Омельченко О.А. Функциональная морфология овариальной ткани в условиях низкотемпературной консервации (–196°С) под защитой полиэтиленоксида м.м. 400 и без него: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 1977. – 19 с.

26. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К.: Урожай. –1968. – 254 с.
27. Паращук Ю.С., Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. Влияние различных условий криоконсервации на выживаемость спермиев человека // Криобиология. – 1985. – №4. – С. 22–28.
28. Петрушко М.П. Цитогенетический анализ нативных и деконсервированных эмбрионов человека методом флюоресцентной гибридизации in situ // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2004. – №3. – С. 339–344.
29. Салтовський Д.В., Прокопюк О.С., Лазуренко В.В та ін. Використання аутотрансплантації оваріальної тканини у лікуванні посткастраційного синдрому // Трансплантологія. – 2003. – №1. – С. 186–187.
30. Скидан Н.П. Влияние условий криоконсервирования на морфо-функциональные свойства спермиев человека при патоспермии: Дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1988. –129 с.
31. Смаглий Н.Ю. Биохимические свойства спермы человека при криоконсервировании и некоторых видах патологии: Автореф. дис. ... канд. биол наук. – Харьков, 1990. – 18 с.
32. Чадаев В.Е. Аллотрансплантация криоконсервированной овариальной ткани в амниотической оболочке, как метод коррекции при эндокринном бесплодии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 1988. – 23 с.
33. Чуб Н.Н. Морфофункциональное состояние овариальной ткани человека на этапах низкотемпературного консервирования: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1988. – 23 с.
34. Чуб Н.Н., Крамар М.И., Юрченко Г.Г., Родионова В.Л. Влияние вредных условий производства на сперматогенез // Сб. тр. XII Междунар. научно-техн. конф. «Экология и здоровье». – 2004. – Т. 2. – С. 410–413.
35. Чуб Н.Н., Родионова В.Л., Крамар М.И., Щеголева Т.Ю. Влияние адреналина и пентоксифиллина на подвижность нативных и криоконсервированных спермиев человека // Експериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики. – Харків, 2007. – С. 121–122.
36. А.с. 1017251 СССР, МКИ А 01 N 1/00. Способ консервирования ткани яичника человека / В.И. Грищенко, Г.С. Лобынцева, Л.Г. Демина и др. (СССР); заявитель и патентообладатель Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР; №3345995; заявл. 29.06.1981; опубл. 15.05.83. Бюл. №18.
37. Пат. №70803. Україна. А. Спосіб низкотемпературного консервування сперми донорів / В.І. Грищенко, Н.Н. Чуб, М.І. Крамар, В.Л. Родіонова; №20031212833; заявлено 29.12.2003, опубл. 15.10.2004. – Бюл. №10.
38. Пат. №46451 Україна МПК C12N 5/00. Спосіб підвищення якості ембріонів людини / В.І. Грищенко, М.П. Петрушко, В.І. Піняєв та ін.; заявлено 15.06.2009; опубл. 25.12.2009. – Бюл. №24.
39. Пат. №56007, Україна, МПК AO1N1/02. Спосіб кріоконсервування сперміїв людини / В.І. Грищенко, І.В. Черкашина, І.М. Кучков; заявлено 27.12.2008; опубл. 25.12.2009. – Бюл. №24.
40. Agarwal P., Ranganathan N., Kattal F. et al. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 81. – P. 342–348.
41. Anger J.T., Gilbert B.R., Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results // J. Urol. –2003. –Vol. 170. – P. 1079–1084.
42. Blaxter J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring // Nature. – 1953. – Vol. 172, №4391. – P. 1189–1190.
43. Brezinova J.B., Oborna I., Fingerova H. et al. Efficiency of cryoembryotransfer using embryos frozen in the pronuclear stage // Ceska Gynekol. – 2004. – Vol. 69, №3. – P. 167–172.
44. Donnez J., Dolmans M. M., Pirard C. et al. Allograft of ovarian cortex between two genetically non–identical sisters: Case Report // Human Reprod. – 2007. – Vol. 22, №10. – P. 2653–2659.

45. Grischenko V.I., Tchoob N.N., Dunaevskaya A.V. et al. Cooling-freezing rate effect on human spermatozoa integrity // Proceedings of 43th Annual Meeting of the Society for Cryobiology Cryo 2006. – Hamburg, 2006. – P. 98.
46. Harrison R J., Mandl A. M., Eckstein P. The structure of the ovary // The ovary. – London: Academic Press, 1962. – P. 143–182.
47. Huang C., Lee T., Chen S. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, №1. – P. 122–128.
48. Kim S.S., Hwang I.T., Lee H.C. Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function // Fertil. Steril. – 2004 – Vol. 82, №4. – P. 930–932.
49. Kopeika E.F., Drokin S.I., Cherepanov V.V. et al. Oxygen and fish spermatozoa cryoresistance // Proceedings of the 34th Annual Meetting of the Society for Cryobiology CRYO 97. – Barcelona, 1997. – P. 66.
50. Kopeika E.F., Neifakh A.A., Zhukinsky V.N. Method of evaluation of genetic apparatus defects of cryopreserved fish sperm during embryo development // CryoLetters. – 1994. – Vol. 15, №4. – P. 245–250.
51. Kopeika E., Kopeika. J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // Fish Spermatology / Ed. by S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward, Gh. Rafiee. – Oxford: Alpha Science, 2007. – P. 347–396.
52. Kopeika J., Kopeika E., Zhang T. et al. Effect of DNA repair ingibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (Misgurnus fossilis) embryos derived from cryopreserved sperm // Theriogenology. – 2004. – Vol. 61. – P. 1661–1673.
53. Kumasako Y., Kumon M., Utsunomiya T. et al. Successful pregnancy after the vitrification of zygotes using commercial vitrification solutions and conventional straws to protect against infections in liquid nitrogen // J. Assist. Reprod. Genet. – 2005. – Vol. 22, №1. – P. 33–35.
54. Labbe C. Maisse Y. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane // Aguaculture. – 1996. – Vol. 145. – P. 281–294.
55. Lassale B., Testart J., Renard J. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol // Fertil. Steril. – 1985. – Vol. 44, №5. – P. 645–651.
56. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells // Cryobiology. – 1966. – Vol. 2, №4. – P. 181–192.
57. Montag M., Van der Ven H., Dorn C. Birth after double cryopreservation of human oocytes at metaphase II and pronuclear stages // Fertil. Steril. – 2006. – Vol. 85, №3. – P. 751.
58. Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival // Cryobiology. – 2005. – Vol. 51. – P. 241–249.
59. Mounib M.S. Hwang P.C., Idler D.R. Cryogenic preservation of Atlantic cod (Gadus morhua) sperm // J. Fish. Res. Board of Canada. – 1968. – Vol. 25, №12. – P. 2623–2631.
60. Nawroth F., Rahimi G., Isachenko E. Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends // Semin. Reprod. Med. – 2005. – Vol. 23, №4. – P. 325–335.
61. Nawroth F., Isachenko V., Dessole S. et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants // CryoLetters. –2002. – Vol. 23, №2. – 2002. – P. 93–102.
62. Ott A.G., Horton H.F. Fertilizing of steelhead trout (Salmo gairdneri) eggs with cryopreserved sperm // J. Fish Res. Board of Canada. – 1971. – Vol. 28, №12. – P. 1915–1918.
63. Pal L., Kovacs P., Witt B. et al. Postthaw blastomere survival is predictive of the success of frozen–thawed embryo transfer cycles // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 82, №4. – P. 821–826.
64. Polge, C., Smith, A.V., Parkes, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures // Nature. – 1949. – Vol. 164. – P. 666.
65. Purdy P.H., Graham J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility // Biol. Reprod. – 2004. – Vol. 71. – P. 522–527.

66. Pustowka C., McNiven M.A., Richardson G.P., Lall S.P. Source of dietary lipid affects sperm plazma membrane integrity and fertility in rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) after cryopreservation // Aquaculture Research. – 2000. – Vol. 31. – P. 297–305.
67. Schroder A.K., Banz C., Katalinic A. Counselling on cryopreservation of pronucleated oocytes // Reprod. Biomed. Online. – 2003. – Vol. 6, №1. – P. 69–74.
68. Sherman J.K., Bunge R.G. Observations on preservations of human spermatozoa // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1953. – Vol. 82. – P. 686–688.
69. Sutcliffe A.G. Follow-up children conceived from cryopreserved embryos // Mol. Cell. Endocrinol. – 2000. – Vol. 27, №1–2. – P. 91–93.
70. Troup S.A., Matson P.L., Critchlow J.D. et al. Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage, or expanded blastocyst stages // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 1991. – Vol. 38, №2. – P. 133–139.
71. Wang J., Yap Y., Matthews C. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16, №11. – P. 2316–2319.
72. Watson P. F., Holt W. V. Cryobanking the genetic resource. – London, New York: Taylor & Francis, 2000. – 463 p.
73. Williot P., Kopeika E.F., Gontcharov B.F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (Acipenser baeri Brandt) // Aquaculture. – 2000 – Vol. 189. – P. 53–61.

Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез

Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач*, Кирошка В.В., В.Д. Устиченко, С.Б. Билявская, А.В. Пахомов, И.И. Самченко, Г.В. Дудецкая

Отдел криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: evlegach@mail.ru*

1. Проблемы и перспективы лечения заболеваний эндокринной системы методом трансплантации

Заболевания эндокринной сферы в общей структуре патологий занимают значительное место. Главным фактором быстрого роста заболеваемости в Украине является неблагоприятная экологическая ситуация вследствие аварии на Чернобыльской атомной станции и загрязнения территорий радиоактивными изотопами.

По данным ВОЗ патологией щитовидной железы страдает более 200 млн человек. Только за последние 5 лет в экономически развитых странах абсолютный прирост числа вновь выявленных заболеваний эндокринной системы составил 51,8% среди женщин и 16,7% среди мужчин [10]. Смертность от сахарного диабета составляет 5,2% от общей летальности, а число людей, страдающих диабетом, возрастет к 2030 году почти до 366 млн [35]. Осложнения сахарного диабета приводят к ранней инвалидизации трудоспособного населения. Первичная хроническая надпочечниковая недостаточность встречается редко, но ее развитие после отмены глюкокортикоидов, назначенных в качестве курса противо-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 361–400.
© Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач и др., 2012

воспалительной и иммуносупрессивной терапии, наблюдается у 50–70% больных [5]. Лечение кортикостероидами приводит к осложнениям: артериальной гипертонии, остеопорозу, ожирению, стероидному диабету, стероидным язвам, трофическим изменениям кожи. В настоящее время основным методом лечения эндокринных заболеваний является заместительная гормональная терапия. Однако она не может предотвратить развитие осложнений и сама может быть причиной их возникновения. На современном этапе развития эндокриноло гии важным является достижение непрерывной и адекватной регуляции уровня гормонов у пациента, страдающего эндокринным нарушением. К сожалению, при простом введении гормонов такая тонкая регуляция невозможна.

Используемые сокращения
↓LN_2 – погружение в жидкий азот
3β-ГСД – 3β-гидроксистероиддегидрогеназа
АКТГ – адренокортикотропный гормон
БА – бронхиальная астма
ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
НЖ – надпочечные железы
НК – нильский красный
ОВА – овальбумин
ОКНП – органотипическая культура надпочечников
ОКС – органотипическая культура семенников
СКС – суспензия клеток семенников
ТС – ткань семенников
ХГ – хорионический гонадотропин
ЩЖ – щитовидная железа
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

Трансплантация культуры клеток либо ткани эндокринных желез является альтернативным методом лечения гормональной недостаточности, при котором сохраняется нативная нейроэндокринная регуляция. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют об успешном лечении сахарного диабета и его осложнений [38], субклинического и послеоперационного гипотиреоза, первичной хронической надпочечниковой недостаточности и андрогендефицитного состояния методом трансплантации [14]. Во многих работах данный метод оценен как более физиологичный по сравнению с традиционной медикаментозной терапией. Трансплантированные эндокринные ткани, кроме синтеза и секреции соответствующих гормонов, способны продуцировать биологически активные медиаторы в основном пептидной природы, кото-

рые выполняют функции как паракринных, так и аутокринных физиологических регуляторов.

На современном этапе развития биотехнологий все чаще применяют клеточное культивирование. Однако при использовании клеточных трансплантатов для лечения эндокринных нарушений необходимо учитывать, что функциональной единицей эндокринных тканей являются конгломераты клеток (фолликулы, островки и др.), поэтому в трансплантате важно сохранить нативную тканевую архитектуру и регуляторные взаимоотношения, а это возможно лишь при получении органотипических культур.

Потребность в долгосрочном хранении донорского материала способствовала разработке методов криоконсервирования клеток и тканей эндокринных желез [3, 14]. Согласно данным статистики лишь в экономически развитых странах более 150 тыс. человек ежегодно нуждаются в пересадке донорских органов и тканей. Например, в США 30 тыс. человек включены в «листы ожидания» донорской почки, но лишь 10% из них имеют шанс дождаться трансплантата. Аллотрансплантация (пересадка органов и тканей от человека человеку) относится, пожалуй, к самой острой проблеме современной трансплантологии. Помимо недостатка аллогенного трансплантационного материала, другим лимитирующим фактором при аллотрансплантации являются затраты. В США трансплантация почки стоит около 90 тыс. долларов, а последующие ежегодные расходы на лекарства, препятствующие отторжению пересаженного органа, составляют 7 тыс. долларов в месяц.

В связи с нехваткой органов для трансплантации многие исследователи все больше внимания уделяют ксенотрансплантации, причем альтернативным источником донорских тканей и органов для человека, прежде всего, рассматриваются свиньи. Многообещающим достижением современной генной инженерии явилось создание в 2001–2002 гг. нокаутных свиней, лишенных гена, который кодирует синтез фермента галактозил-трансферазы, ответственного за продукцию Gal-олигосахаридов [34]. Органы этих животных не способны вызывать гиперострое отторжение (наиболее тяжелое осложнение) и таким образом появляется реальная возможность устранить факторы гистонесовместимости для успешной ксенотрансплантации. Считается, что в ближайшем будущем

наиболее востребованной будет ксенотрансплантация островков поджелудочной железы свиньи, а также других клеточных трансплантатов. Основанием для таких соображений является следующее: 1) клеточный трансплантат не содержит эндотелиальных клеток, поэтому не способен вызывать гиперострое отторжение, и для его получения не требуются трансгенно-измененные животные, что устраняет ряд этических проблем; 2) клеточные трансплантаты не требуют долгосрочной, а в некоторых случаях вообще не требуют применения иммуносупрессии. В таком случае отсутствует риск, связанный с инфицированием реципиентов, часто возникающим на фоне угнетения иммунной системы; 3) эффективность введения инсулина и трансплантация островков поджелудочной железы свиньи доказаны временем (свиной инсулин в течение 77 лет использовали для экзогенного введения больным диабетом, и на протяжении двух десятков лет тысячи людей являются реципиентами свиных клеток без проявлений каких-либо признаков вирусной трансмиссии). Метод лечения заболеваний эндокринной сферы путем гетеротопической трансплантации клеток/тканей эндокринных желез перспективен, способен принести ощутимый экономический эффект и значительно улучшить качество жизни реципиентов.

2. Опыт криоконсервирования и трансплантации ткани/клеток различных эндокринных желез

Криоконсервированию ткани/клеток эндокринных желез уделялось немало внимания на протяжении всего периода развития криобиологии, прежде всего, как методу, позволяющему сохранить биологический материал для трансплантации. Было разработано множество способов криоконсервирования с применением различных криопротекторов и режимов замораживания. Наиболее успешные способы дают возможность максимально сохранить исходные свойства клеток желез после размораживания, включая синтез и секрецию гормонов.

В табл. 1 приведены данные об использовании криопротекторов и скоростей охлаждения для криоконсервирования ткани различных желез.

Для низкотемпературного хранения эндокринной ткани применяют как проникающие (пропандиол, ДМСО, глицерин), так

Таблица 1. Криопротекторы и режимы криоконсервирования, применяемые для замораживания тканей эндокринных желез

Типы ткани	Криопротекторы Режимы криоконсервирования
Надпочечные железы	5% ДМСО [2]; 10% ДМСО [39]; 1–3 град/мин [8]
Щитовидная железа	8,5% ПВП; ПЭО-400, 0,35 М сахароза; 1 М глицерин [3]; 7% ДМСО [9]; 10% ДМСО [15]; 15% глицерин 1 град/мин [41]; 5–7 град/мин до –70°С; 85–100 град/мин [15]; 10 град/мин [9]
Семенники	15% глицерин [3]; 6–25 % ДМСО [26]; 10% ДМСО [2]; 5% ДМСО 1 град/мин до температуры кристаллизации и 10 град/мин до –80°С затем $\Downarrow LN_2$ [28]

и непроникающие (сахароза, ПЭО-1500, трегалоза, ПВП) криопротекторы.

В последующих разделах особенности криоконсервирования клеток и тканей различных эндокринных желез будут рассмотрены более подробно.

2.1. Криоконсервирование фрагментов ткани и клеток надпочечников

Скорость охлаждения является основным фактором, который необходимо учитывать при разработке режима криоконсервирования надпочечных желез (НЖ).

При изучении замораживания фрагментов НЖ быка в присутствии 5% ДМСО как криопротектора было показано, что после замораживания со скоростью охлаждения 1–3 град/мин и последующего отогрева сохраняется стимулированная активность мембранно-связанного фермента аденилатциклазы. При увеличении скорости охлаждения до 85–100 град/мин и концентрации ДМСО до 10% активность аденилациклазы сохранялась [6].

Фетальные НЖ, замороженные по трехэтапной программе в присутствии 20% ДМСО, были способны поддерживать уровень кортикостерона на 3-й месяц после аллотрансплантации. Электронно-микроскопический анализ трансплантатов показал отсутствие значительных нарушений криоконсервированной ткани, хотя наблюдалось набухание митохондрий и вакуолей гладкого эндоплазматического ретикулума [45]. Для криоконсервирования кластеров хромаффинной ткани фетальных НЖ также успешно использовали 10% ДМСО [39]. Установлено, что 90% кластеров были морфологически интактными после размораживания и проявляли тироксин-гидроксилазную активность.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины накоплен значительный опыт по криоконсервированию ткани НЖ быков, взрослых свиней и новорожденных поросят. Было показано, что фрагменты НЖ новорожденных поросят являются более криорезистентными по сравнению с тканью взрослых свиней и синтезируют в 1,4 раза больше гормонов после замораживания-отогрева и удаления криопротектора [2]. Стероидогенез фрагментов НЖ новорожденных поросят после криоконсервирования по двухэтапной программе в присутствии 5% ДМСО сохранялся на уровне 85% от контрольных значений [7]. Сравнительный анализ использования двух криопротекторов ДМСО и 1,2-пропандиола показал, что ДМСО в концентрации 5% не угнетает секрецию кортизола срезами НЖ новорожденных поросят, в то время как 1,2-пропандиол проявляет ингибирующий эффект [3].

Эффективность режима криоконсервирования ткани эндокринных желез определяется не только сохранностью морфологической структуры и функциональной активности *in vitro*, но и способностью восстанавливать гормональный уровень после трансплантации у реципиентов с эндокринной недостаточностью. Так, органотипическая культура НЖ новорожденных поросят, криоконсервированная по двухэтапной программе в присутствии 5% ДМСО, обеспечивала повышение уровня кортизола в плазме крови человека в 2–2,5 раза после трансплантации в подкожную жировую клетчатку передней брюшной стенки [1]. При трансплантации криоконсервированной ткани НЖ, удаленной у больных по поводу АКТГ-зависимого синдрома Иценко-Кушинга или доброка-

чественной кортикостеромы, пациентам с идиопатической болезнью Аддисона достоверно увеличился уровень кортизола и снизилось содержание АКТГ в сыворотке крови по отношению к дооперационным показателям [11].

Трансплантация нативных фрагментов НЖ приводила к достоверному увеличению содержания кортизола в плазме крови животных-реципиентов (рис. 1) до 37,92 ± 15,32 нмоль/л на 30-е сутки после операции по сравнению с адреналэктомированными (12,06 ± 8,8 нмоль/л). Достоверное повышение уровня кортизола было также у животных с трансплантатами, обработанными ДМСО (31,13 ± 10,12 нмоль/л). Кортизолпродуцирующая активность трансплантатов, криоконсервированных как с низкой (1 град/мин), так и с высокой скоростью охлаждения (100 град/мин), резко снизилась по сравнению с нативными. При этом более высокий уровень кортизола в плазме крови реципиентов был выше в случае трансплантации быстро замороженных фрагментов по сравнению с медленно замороженными.

В настоящее время существуют режимы замораживания органотипической культуры НЖ, однако такая культура, представляющая собой фрагменты ткани, при долгосрочном культивиро-

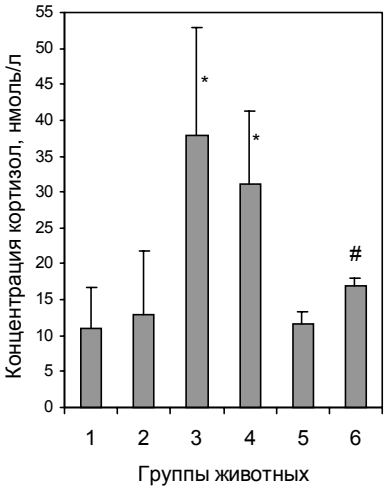


Рис. 1. Концентрация кортизола в плазме крови животных-реципиентов на 30-е сутки после адреналэктомии и трансплантации фрагментов надпочечников новорожденных поросят: 1 – интактные; 2 – адреналэктомированные; 3 – трансплантация нативных фрагментов НЖ; 4 – фрагментов НЖ, преинкубированных с 10% ДМСО; 5 – фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения 1 град/мин; 6 – фрагментов НЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения более 100 град/мин (* – различия достоверны по отношению к интактным животным; # – различия достоверны по отношению к 1 град/мин, $p < 0,05$).

вании не проявляет пролиферативной активности. В процессе культивирования нарушается трофическая поддержка ткани, накапливаются токсические продукты обмена веществ, что приводит к ее деградации на 5–7-е сутки культивирования [21]. Альтернативным источником биологического материала для трансплантации является суспензия клеток либо первичная культура клеток НЖ.

При разработке режима криоконсервирования клеток НЖ учитывали предварительные данные, полученные при замораживании фрагментов. Эффективность режима криоконсервирования оценивали по сохранности[1] и жизнеспособности[2] клеток.

В качестве криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5; 7; 10% на среде 199. Криозащитную среду добавляли в пять этапов с интервалом 1 мин. Замораживание образцов со скоростями охлаждения 1; 5; 10; 15; 20 град/мин до температуры –40°С осуществляли на программном замораживателе «Cryoson» (Германия) со скоростью охлаждения 40 град/мин над зеркалом жидкого азота при постоянной температуре окружающей среды –145...–150°С, после чего их погружали в жидкий азот (–196°С). Также образцы замораживали прямым погружением в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане (37°С) до исчезновения твердой фазы. Контролем служила свежеполученная суспензия клеток надпочечников. Как видно из рис. 2, сохранность клеток снижалась после криоконсервирования по всем использованным программам. Однако наиболее выраженное уменьшение данного показателя – снижение сохранности суспензии клеток – наблюдали при использовании 5% ДМСО и скоростей охлаждения 15, 20, 40 град/мин и прямого погружения в жидкий азот ($\downarrow LN_2$); 7% ДМСО и скоростей охлаждения 20, 40 град/мин и $\downarrow LN_2$; 10% ДМСО и скоростей охлаждения 1, 5, 10, 15, 20 град/мин. Наибольшая сохранность клеток установлена при скоростях охлаждения 1, 5, 10 град/мин с 5 и 7% ДМСО; 15 град/мин с 7% ДМСО; 40 град/мин и $\downarrow LN_2$ с 10% ДМСО.

[1]Сохранность клеток – общее количество клеток после воздействия по отношению к общему количеству клеток до воздействия, выражено в процентах.

[2]Жизнеспособность клеток – количество живых клеток (неокрашенных трипановым синим) по отношению к общему количеству клеток, выражено в процентах.

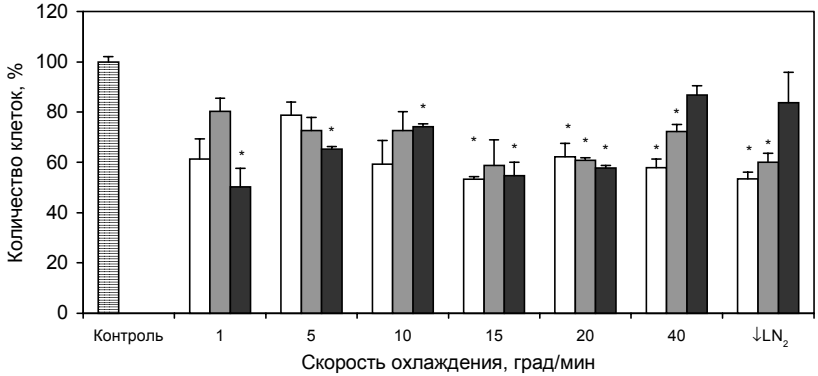


Рис. 2. Сохранность клеток надпочечников взрослых крыс после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения и концентрациями ДМСО (□ – 5%, ▒ – 7%; ■ – 10%; * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$).

Как видно из рис. 3, наиболее выраженное снижение жизнеспособности (40–52%) было после использования скорости охлаждения 40 град/мин и $\downarrow LN_2$ для всех используемых концентраций ДМСО. Наибольшая жизнеспособность клеток (67–77%) установлена при использовании скоростей охлаждения 1, 5, 10, 20 град/мин и 7% ДМСО.

Установлено, что инкубация с криопротектором ДМСО может влиять на уровень гормональной активности стероидогенных клеток. Добавление различных концентраций ДМСО (5, 7, 10%) осуществляли ступенчатым способом с целью минимизации повреждающего действия осмотических факторов. Для удаления криопротектора после 20-минутной инкубации ступенчато уменьшали осмолярность криозащитной среды с последующим центрифугированием в течение 3 мин при 200g. Ступенчатое удаление криопротектора предполагало последовательное разведение криозащитной среды средой 199 с 10% ЭТС. После этого измеряли уровень кортизола в среде инкубации клеток надпочечников новорожденных поросят. Продолжительность инкубации составляла 24 ч. Предобработка 5% раствором ДМСО приводила к стимуляции базальной секреции кортизола (рис. 4). В то же время содержание

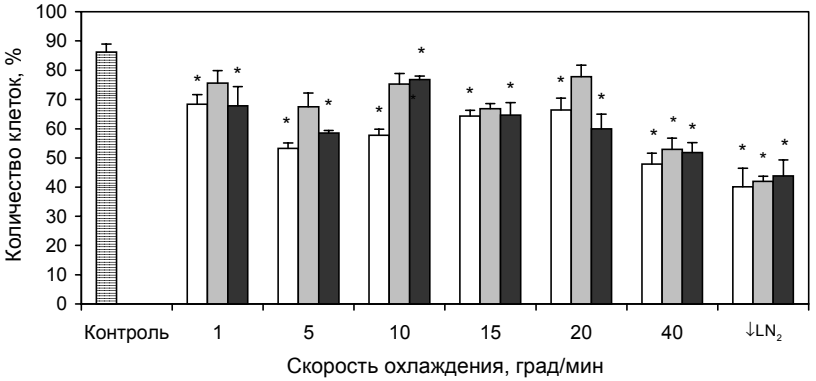


Рис. 3. Жизнеспособность клеток надпочечников взрослых крыс до (контроль) и после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения и концентрациями ДМСО (□ – 5%, ▨ – 7%; ■ – 10%; * – различия достоверны по отношению к контролю, $p<0,05$).

данного гормона в среде инкубации для клеток, предобработанных 7 и 10% растворами ДМСО, сохранялось на уровне контрольных значений со слабовыраженной тенденцией к стимуляции.

Формирование цитоплазматических липидных капель в стероидпродуцирующих клетках надпочечников является неотъемлемым процессом их функционирования. Липидные капли представляют собой скопление нейтральных липидов, обычно триглицеридов или холестериновых эфиров, которые служат депо холестерина для синтеза стероидных гормонов в стероидпродуцирующих клетках НЖ. Для визуализации липидных капель часто используется флуоресцентный краситель нильский красный [25].

Данные рис. 5 свидетельствуют о значительном снижении количества клеток, содержащих липидные капли, после замораживания со скоростями 15, 20, 40 град/мин, $\downarrow LN_2$ и последующего отогрева (см. рис. 2). Образцы, криоконсервированные с использованием скоростей охлаждения 1 град/мин (5 и 7% ДМСО), 5 и 10 град/мин (5, 7, 10% ДМСО), сохраняют количество клеток, окрашенных нильским красным на уровне контрольных значений (63,98%). Таким образом, при оценке клеток на сохранность липидных капель после криоконсервирования достоверные отличия между контроль-

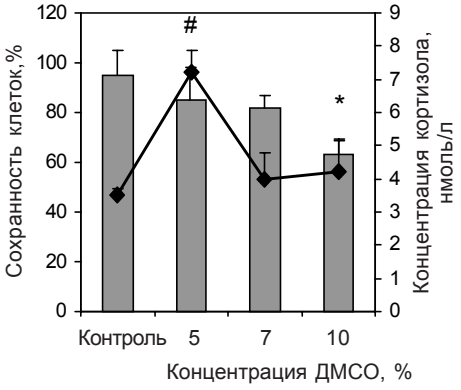


Рис. 4. Влияние преинкубации в различных концентрациях ДМСО на сохранность и базальную секрецию кортизола клеток надпочечников новорожденных поросят (□ – сохранность клеток, —— – концентрация кортизола; различия достоверны по отношению к сохранности клеток (*) и уровню кортизола (#) в контроле, $p < 0,05$).

ным значением и данными после замораживания с низкими контролируемыми скоростями охлаждения отсутствовали. В то время как замораживание с высокими скоростями охлаждения и ↓LN_2 снижает этот показатель практически вдвое.

Одним из методов оценки жизнеспособности стероидпродуцирующих клеток в суспензии является определение активности

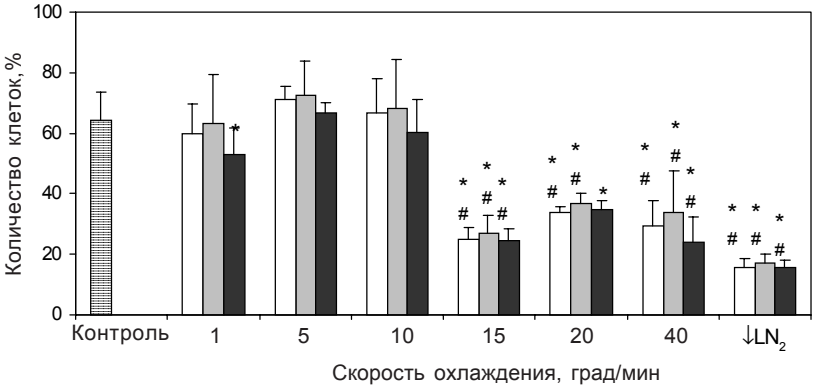


Рис. 5. Количество клеток надпочечников взрослых крыс, включающих НК после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения и концентрациями ДМСО (□ – 5%, ▒ – 7%; ■ – 10%; различия достоверны по отношению к контролю (*) и скоростям охлаждения 1, 5, 10 град/мин (#), $p<0,05$).

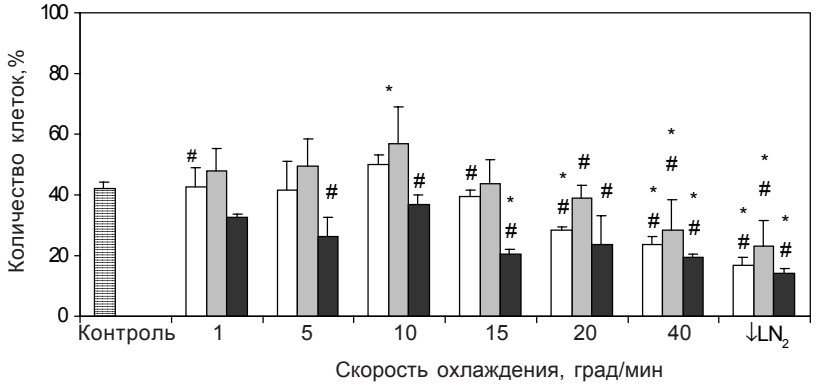


Рис. 6. Количество 3β-ГСД$^+$-клеток после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения и концентрациями ДМСО (□ – 5%, ▒ – 7%; ■ – 10%; различия достоверны по отношению к контролю (*) и скорости охлаждения 10 град/мин с концентрацией ДМСО 7% (**), $p<0,05$).

фермента 3β-ГСД, который обеспечивает конверсию прегненолона в прогестерон и характеризует функциональную активность стероидпродуцирующих клеток [18]. Наличие клеток с фиолетовой окраской восстановленного тетразолия свидетельствует о сохранности стероидпродуцирующих клеток в суспензии.

Как видно из рис. 6, сохранность 3β-ГСД$^+$-клеток после криоконсервирования (см. рис. 2) оставалась на уровне контрольных значений (42,05%) в случае охлаждения со скоростями 1; 5 град/мин (5 и 7% ДМСО), 10 град/мин (5% ДМСО), 15 град/мин (7% ДМСО). Охлаждение суспензии со скоростями охлаждения 20, 40 град/мин и $\downarrow LN_2$ привело к снижению количества 3β-ГСД$^+$-клеток. В случае замораживания суспензии при использовании скорости охлаждения 10 град/мин (7% ДМСО) сохранность 3β-ГСД$^+$-клеток была достоверно выше по сравнению с контролем. Таким образом, использование скорости охлаждения 10 град/мин и 7% ДМСО для замораживания надпочечных желез крыс способствует сохранности наибольшего количества клеток, обладающих активностью 3β-ГСД.

Поскольку в состав суспензии клеток надпочечников входят разные популяции клеток, мы выявили влияние скоростей охлаждения на сохранность клеток мозгового вещества надпочечников (хромаффинные клетки). Хромогранин А – белок, который содержится во многих эндокринных и неэндокринных клетках и играет важную роль в секреции и накоплении гормонов (адреналина и норадреналина). Поэтому выявление клеток, содержащих хромогранин А, свидетельствует о наличии хромаффинных клеток в суспензии.

Как видно из рис. 7, сохранность клеток, содержащих хромогранин А, после криоконсервирования значительно снижалась относительно контроля (10,90%) в случае охлаждения со скоростями 1, 5, 10, 20, 40 град/мин и $\downarrow LN_2$. Использование скорости охлаждения 15 град/мин способствует сохранности наибольшего количества клеток (8,63%), содержащих хромаффинные гранулы.

Следовательно, при криоконсервировании суспензии клеток НЖ необходимо использовать низкие (до 10 град/мин) скорости охлаждения, которые позволяют получить наибольшее количество жизнеспособных ядерных клеток. Замораживание со скоростями

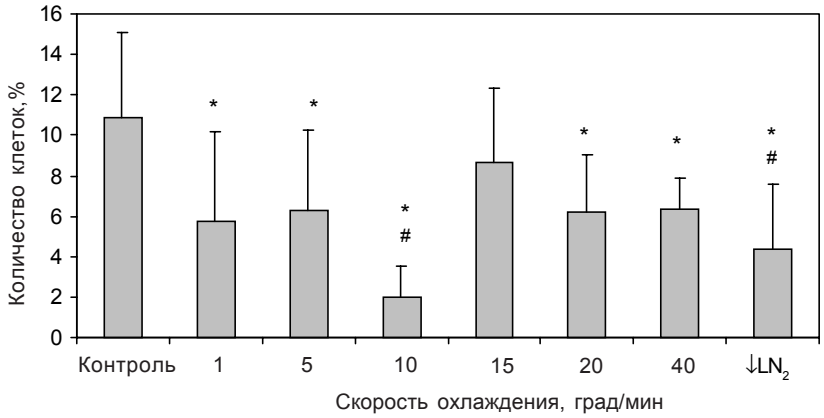


Рис. 7. Количество клеток, содержащих хромогранин А, после криоконсервирования с 7% ДМСО (различия достоверны по отношению к контролю (*) и скорости охлаждения 15 град/мин (#), $p<0,05$).

охлаждения более 10 град/мин и использование $\downarrow LN_2$ значительно снижают показатели жизнеспособности клеток НЖ.

На сегодняшний день существуют данные о том, что криоконсервирование позволяет не только сохранять жизнеспособность и гормональную функцию клеток эндокринных желез, но и может влиять на иммуногенность ткани. Уменьшение иммуногенности ткани очень важно для пролонгирования выживаемости трансплантата. Теоретическая основа для объяснения феномена изменения иммуногенности ткани после криоконсервирования заложена в работах M.J. Taylor с соавт. [42, 43]. Показано, что антигенпредставляющие клетки, а именно макрофаги и дендритные клетки, присутствующие в тканях, имеют высокую чувствительность к скорости охлаждения. Оптимум выживаемости лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток был установлен в диапазоне скоростей охлаждения 0,3–5 град/мин. Авторы высказали предположение, что при использовании режима замораживания, который обеспечивает максимальное снижение жизнеспособности антигенпредставляющих клеток, но позволяет сохранить жизнеспособными остальные клетки, можно добиться уменьшения иммуногенности пересаживаемой ткани. N. Ketheesan с соавт. подтвердили данный факт [29]. Значительное уменьшение иммуногенности клапанов аорты и кожи в смешанной лимфоцитарной реакции было установлено при использовании скорости охлаждения выше 30 град/мин, но не 1 и 5 град/мин. M.J. Taylor с соавт. [43] наблюдали уменьшение количества лимфоидных клеток на 10–40% при охлаждении со скоростью 20 град/мин, а при скорости охлаждения более 75 град/мин они полностью отсутствовали.

В настоящее время многочисленные данные свидетельствуют о тесном регуляторном взаимодействии между нейроэндокринной и иммунной системами. Надпочечники – это один из важнейших органов нейроиммуноэндокринной системы, который координирует ответ организма на стресс, а также поддерживает гомеостаз. Известно, что в корковом и медуллярном веществах надпочечной железы содержится значительное количество резидентных макрофагов [16], дендритных клеток [36], клеток, экспрессирующих антигены главного комплекса гистосовместимости класса II [32]. Очевидно, что высокое содержание макрофагов и дендритных

клеток должно отражаться на выживаемости ткани после трансплантации. Мы исследовали влияние криоконсервирования с различной скоростью охлаждения на иммуногенность ткани НЖ и результат аллотрансплантации фрагментов ткани надпочечников адреналэктомированным мышам. Надпочечники мышей криоконсервировали в присутствии 10% ДМСО с различными скоростями охлаждения (1 и 10 град/мин) с использованием программного замораживателя «Cryoson» (Германия); 40 и 100 град/мин – ступенчатым погружением в жидкий азот. Отогрев осуществляли на водяной бане при 37°С. Криопротектор удаляли путем ступенчатой замены среды консервирования на среду 199. Окрашивание моноклональными антителами («Abcam») осуществляли в соответствии со стандартными протоколами.

Полученные результаты показали, что количество дендритных клеток и макрофагов после криоконсервирования варьирует в зависимости от скорости охлаждения, используемой при криоконсервировании надпочечных желез (рис. 8). При использовании низкой скорости охлаждения (1 град/мин) после замораживания-отогрева эти клетки сохраняются в суспензии клеток, полученной из фрагментов ткани НЖ, а при более высоких скоростях охлаждения они не обнаруживаются. Для реализации эффекта элими-

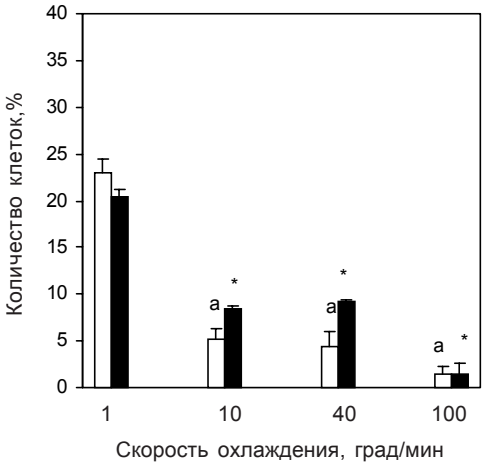


Рис. 8. Экспрессия специфических маркеров дендритных клеток и макрофагов в клетках, полученных из криоконсервированных с различными скоростями охлаждения фрагментов ткани НЖ (а, * – статистически достоверные различия между количеством клеток $CD11c^+$ (□) и $CD11b^+$ (■) и соответствующими показателями, полученными при криоконсервировании со скоростью охлаждения 1 град/мин, $p < 0{,}01$).

Таблица 2. Выживаемость мышей, уровень кортикостерона в крови и количество Т-лимфоцитов $CD4^+$ и $CD8^+$ в трансплантате

Группы животных	Тип трансплантата	Скорость охлаждения ФТ	Выживаемость на 26-е сутки, %	Уровень кортикостерона, нг/мл	Количество клеток $CD4^+/CD8^+$
Адреналэктомия	–	–	0	6,9 ± 1,2	–
Интактный контроль	–	–	100	142 ± 19,5	–
Адреналэктомия, трансплантация нативных ФТ	Сингенный	–	100	140 ± 28,6	–
Адреналэктомия, трансплантация криоконсервированных ФТ	Сингенный	1 град/мин	100	144,3 ± 18,6	–
		более 100 град /мин	100	104,6 ± 15,2	–
Адреналэктомия, трансплантация нативных ФТ	Аллогенный	–	30	8,4 ± 2,7	8,9/23,5
Адреналэктомия, трансплантация криоконсервированных ФТ	Аллогенный	1 град/мин	80	22,4 ± 6,5	5,3/4,9
		более 100 град/мин	70	61,8 ± 9,2	3,7/3,8

Примечание: ФТ – фрагменты ткани.

нации антигенпредставляющих клеток из ткани применяют кратковременное (48 ч) культивирование после размораживания.

Выживаемость адреналэктомированных животных на 26-е сутки после трансплантации фрагментов ткани НЖ, показатели уровня кортикостерона в плазме крови и иммуногистохимический анализ аллографта (табл. 2) показывают, что криоконсервированные аллографты фрагментов ткани НЖ вызывают менее выраженную реакцию отторжения, чем нативные.

Таким образом, показана не только возможность криоконсервирования фрагментов, срезов и клеток НЖ различного видового происхождения, но и результаты их успешного применения для восстановления уровня глюкокортикоидов после трансплантации реципиентам с гормональной недостаточностью.

2.2. Криоконсервирование фрагментов ткани и клеток щитовидной железы

Первые попытки криоконсервирования ткани щитовидной железы (ЩЖ) были предприняты в 50-х годах прошлого столетия, а размороженные ЩЖ использовали для трансплантации в эксперименте на животных. При криоконсервировании ткани ЩЖ используют криопротекторы глицерин, поливинилпирролидон [3], ДМСО [27].

Анализ литературных данных свидетельствует, что диапазон используемых концентраций ДМСО, обеспечивающий наиболее полное сохранение структуры и функции ткани, составляет 5–10%. При более высоких концентрациях (15–20%) увеличивается его токсическое действие, проявляющееся в негативном влиянии на активность клеточных транспортных систем, в частности системы захвата йодида [3, 13]. При этом криобиологической задачей является подбор концентрации криопротектора, времени его насыщения и скорости замораживания. Необходимо, чтобы эффекты токсического действия криопротектора на клеточные процессы не превалировали над его криозащитными свойствами.

Экспериментально установлено, что оптимальными условиями для сохранения жизнеспособности клеток во фрагментах объемом 1–3 мм^3 ЩЖ человека являлось использование 7–10% ДМСО и медленного замораживания с предварительным насыщением при 4°С [30].

В экспериментах по криоконсервированию фрагментов ЩЖ новорожденных поросят было показано, что максимальная жизнеспособность клеток, а также сохранение базальной и стимулированной секреции Т3 и Т4 органотипической культурой ЩЖ новорожденных поросят наблюдаются при использовании концентрации ДМСО 7% и скорости охлаждения 10 град/мин.

Режим насыщения ткани криопротектором является важным при криоконсервировании ЩЖ. В табл. 3 приведены значения секреции тироксина после инкубации органотипической культуры ЩЖ в среде с 7% ДМСО при различных температурах. Криопротектор удаляли путем ступенчатой замены средой 199. Содержание Т4 в среде инкубации измеряли радиоиммунологическим методом с использованием тест-набора «РИА-Т4-ст» (Беларусь).

Способность к накоплению I^{131} тканью ЩЖ определяли с использованием NaI^{131} с активностью 1,2 мБк/мл.

Из данных табл. 3 следует, что наиболее повреждающим для тироцитов является режим насыщения ДМСО, включающий ступенчатую инкубацию по 15 мин при температурах 4 и 37°С. При этом повышение температуры до 37°С может увеличивать токсическое действие криопротектора на клеточный метаболизм в результате угнетения активности аденилатциклазы [27] и изменения йодирования тиреоглобулина [13]. Для последующего криоконсервирования использовали наиболее оптимальный режим насыщения криопротектором – 15 мин при 22°С.

Таблица 3. Секреция Т4 органотипической культуры ЩЖ после криоконсервирования при различных режимах инкубации с 7% ДМСО

Инкубация с ДМСО	Содержание Т4	
	нмоль/мг белка	% от контроля
Без инкубации	30,47 ± 4,36	100
15 мин при 4°С	29,78 ± 3,81	97,7
15 мин 4°С и 15 мин при 37°С	24,76 ± 2,11	81,2*
15 мин при 22°С	32,48 ± 5,15	106,5
30 мин при 22°С	29,15 ± 1,01	95,6

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Установлено, что криоконсервированная со скоростью охлаждения 10 град/мин ткань ЩЖ после отогрева и удаления криопротектора сохраняет способность к секреции тироксина и аккумуляции йода в течение достаточного времени культивирования. Через 2 суток после отогрева наблюдаются активация захвата йода тканью ЩЖ и соответственно увеличение уровня секреции тироксина (рис. 9).

Гистологическое исследование показало, что ткань ЩЖ после отогрева сохраняла свою фолликулярную структуру, ультраструктурные изменения в тироцитах не носили деструктивного характера, отмечалась достаточно высокая сохранность гистоструктуры тиреоидной паренхимы.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины был разработан способ криоконсервирования не только

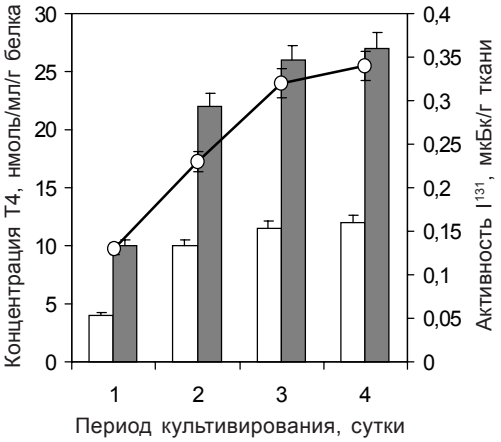


Рис. 9. Динамика аккумуляции I^{131}, базальной и ТТГ-стимулированной секреции тироксина в среду культивирования ткани ЩЖ после отогрева (□ – Т4 базальный, ▨ – Т4 стимулированный, —— – активность I^{131}).

фрагментов ткани, но и первичной культуры щитовидной железы новорожденных поросят. Суспензию клеток ЩЖ, полученную ферментативным методом, культивировали в культуральных флаконах («Sarstedt», США) на среде 199, обогащенной 10% ЭТС, при 37°С в атмосфере 5% CO_2 в течение 6 суток. Снятие культуры с подложки проводили путем трипсинизации с использованием 0,25% смеси растворов трипсина и версена в соотношении 1:1, после чего криоконсервировали со скоростью охлаждения 1 град/мин [2] в присутствии 7,5, 10, 15% ДМСО и тех же концентраций криопротектора с добавлением 25% ЭТС («Sigma», США) на программном замораживателе «Cryoson» (Германия).

Наиболее высокие показатели сохранности и жизнеспособности были характерны для образцов культуры, криоконсервированных с 10 и 15% ДМСО. После помещения размороженной культуры в среду культивирования конфлюентность монослоя достигала 100% у образцов, криоконсервированных в присутствии 15% ДМСО (рис. 10).

Достаточно высокая активность первичной культуры по формированию монослоя (70%) была также отмечена в образцах, криоконсервированных с 10% ДМСО (рис. 11). В случае применения концентраций ДМСО ниже 10% конфлюэнтность монослоя не превышала 30%.

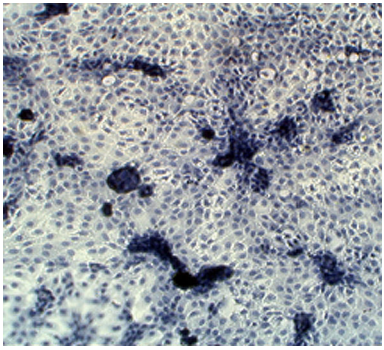


Рис. 10. Первичная культура клеток ЩЖ, криоконсервированных со скоростью охлаждения 1 град/мин в присутствии 15% ДМСО и 25% ЭТС, ×200.

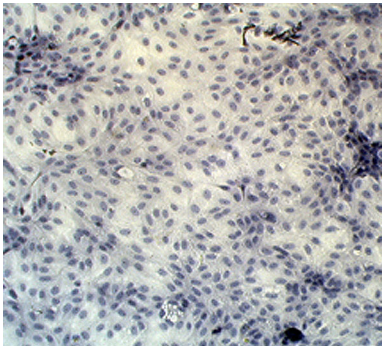


Рис. 11. Первичная культура клеток ЩЖ, криоконсервированная со скоростью охлаждения 1 град/мин в присутствии 10% ДМСО и 25% ЭТС, ×200.

Клиническая трансплантация криоконсервированной аутологичной ЩЖ была проведена несколькими группами исследователей. В работе T. Okamoto [33] ткань ЩЖ четырех пациентов, оперированных по поводу болезни Гревса, была заморожена и использована для дальнейшей аутотрансплантации. В течение всего периода после субтотальной тиреоидэктомии, который составлял в среднем 2 года, пациенты получали 50–150 мкг/сутки L-тироксина. После трансплантации у трех пациентов исчезли симптомы гипотиреоза и уменьшился уровень ТТГ, в связи с чем пероральная гормональная терапия была отменена. И, хотя у одного из пациентов через 6 месяцев после отмены L-тироксина, возобновились признаки гормональной недостаточности, авторы считают данный подход к терапии послеоперационного гипотиреоза перспективным.

Такой же позитивный результат аутотрансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ был получен T.K. Thuso [44]: у 11 из 13 пациентов (84,6%) уровни Т3 и Т4 увеличились, а уровень ТТГ уменьшился. Двое пациентов стали эутиреоидными и им была отменена заместительная гормональная терапия. Захват радиоактивного йода показал наличие жизнеспособной и функционирующей ткани ЩЖ в месте трансплантации.

Гормонопродуцирующая функция криоконсервированной ткани ЩЖ после трансплантации была изучена в экспериментах на животных с моделью постоперационного гипотиреоза, который моделировали при помощи ретроградной тиреоидэктомии. Ткань ЩЖ, криоконсервированная с использованием скорости охлаждения 1 град/мин в присутствии 7% ДМСО, трансплантированная непосредственно после отогрева и удаления криопротектора, характеризовалась уменьшением гормональной активности после трансплантации (рис. 12). При трансплантации криоконсервированной органотипической культуры ЩЖ, подвергнутой двухсуточному культивированию при 37°С после размораживания, возрастал уровень Т4 и соответственно снижался уровень ТТГ в плазме крови крыс. Эти данные свидетельствовали о восстановлении гормонопродуцирующей активности трансплантатов криоконсервированной органотипической культуры ЩЖ после культивирования.

Вероятно, помещение ткани ЩЖ после криоконсервирования в питательную среду для культивирования следует рассматривать как адаптационный период, который позволяет избавиться от погибших фолликулярных структур и активизировать процессы гормонопродукции и пролиферации. Если считать, что функционирование трансплантата на ранних сроках после пересадки опре-

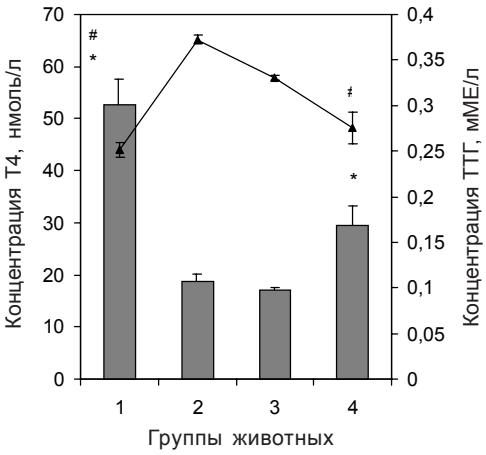


Рис. 12. Уровни Т4 и ТТГ в плазме крови контрольных (1), тиреоидэктомированных (2) крыс и крыс с трансплантацией: криоконсервированной ткани ЩЖ новорожденных поросят (3); криоконсервированной и рекультивированной органотипической культуры ЩЖ новорожденных поросят (4) (□ – Т4, —— – ТТГ; *, # – различия значений Т4 и ТТГ достоверны по сравнению с показателями тиреоидэктомированных животных соответственно, $p < 0,05$).

деляется сохранившимися фолликулярными единицами, а на более отдаленных сроках – новообразованными, то понятно преимущество гормонопродукции криоконсервированной и культивированной ткани ЩЖ по сравнению с криоконсервированной.

Таким образом, в наших исследованиях была показана возможность успешного сохранения структурно-функциональных свойств культур клеток и ткани ЩЖ после криоконсервирования, а также перспективность применения криоконсервированных культур для дальнейшей трансплантации.

2.3. Криоконсервирование фрагментов ткани и клеток семенников

Криоконсервирование сперматозоидов и герминативных клеток-предшественников широко используется для искусственного оплодотворения. Меньше внимания уделяется криоконсервированию гормонопродуцирующих клеток Лейдига.

Возможность криоконсервирования суспензии клеток Лейдига семенников была рассмотрена в единичных работах [20, 40]. При одинаковой скорости охлаждения 1 град/мин были изучены три среды криоконсервирования, содержащие 10, 15 и 20% ДМСО. После замораживания в присутствии 15% ДМСО клетки Лейдига имели сохранность 75% и были способны к базальной и ХГ-стимулированной секреции тестостерона. Также было установлено, что при замораживании тестикулярной ткани человека наилучшими криопротекторными свойствами обладал ДМСО по сравнению с глицеролом и пропандиолом [28].

На основании приведенных данных, для разработки способа криоконсервирования ткани семенников (ТС) новорожденных поросят нами был выбран криопротектор ДМСО (10%), в котором ТС предварительно инкубировали в течение 20 мин. Замораживание осуществляли по двухэтапной программе, варьируя скорости на первом этапе, которые составили 1, 5 и 10 град/мин. Образцы замораживали до –60°С с последующим быстрым погружением в жидкий азот. Также использовали замораживание над зеркалом жидкого азота со скоростью более 100 град/мин. При сравнении стероидогенной активности ТС установлено, что минимальная выбранная скорость охлаждения (1 град/мин) и скорости выше

10 град/мин являются повреждающими для базальной продукции тестостерона (рис. 13), который измеряли радиоиммунологическим методом в среде инкубации.

При криоконсервировании эндокринных тканей важно учитывать влияние факторов низкотемпературного охлаждения на параметры стимулируемой секреции гормонов. Адекватное реагирование гормонопродуцирующих клеток на введение специфического стимулирующего агента является объективным критерием функциональной состоятельности трансплантационного материала и впоследствии позволит трансплантату стать полноценно интегрированным в нейроэндокринную систему реципиента. Криоконсервированный биоматериал ТС необходимо тестировать в условиях действия специфического тропного гормона ХГ. Установлено, что замораживание со скоростью свыше 10 град/мин негативно влияло на секрецию тестостерона, стимулированную ХГ (рис. 13). При скорости 1 град/мин не наблюдалось отличий в секреции гормона по сравнению с контролем, тогда как при скорости 5 град/мин отмечено достоверное повышение содержания тестостерона в среде инкубации.

Анализ жизнеспособности клеток ТС после замораживания-отогрева методом суправитального окрашивания с трипановым синим выявил уменьшение количества клеток, исключающих краситель, до 76% при использовании скорости охлаждения 10 град/мин и до 71% по сравнению со свежевыделенными клетками при скорости 85–100 град/мин. Для ТС, криоконсервированной со скоростью охлаждения 1 град/мин, этот показатель составил 84%. Наибольший

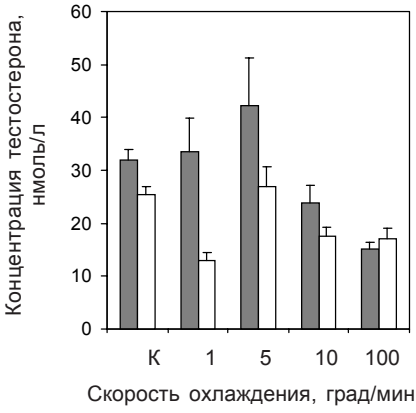


Рис. 13. Базальная и ХГ-стимулированная активность нативной ТС (контроль) и после криоконсервирования в растворе 10% ДМСО со скоростями охлаждения 1; 5; 10 и 100 град/мин (☐ – ХГ, ▩ – базальная; К – контроль.

процент жизнеспособных клеток (91%) установлен при криоконсервировании ТС со скоростью охлаждения 5 град/мин.

Известно, что медленное замораживания позволяет избежать образования внутриклеточных кристаллов льда, повреждающих клетку, однако приводит к повышению внутриклеточной концентрации солей [31]. Так называемый «эффект раствора» является одним из факторов, способных оказывать негативное влияние на структурно-функциональные свойства клеток при криоконсервировании [3]. Поэтому для каждого типа клеток выбирают оптимальную скорость охлаждения, при которой внутриклеточное кристаллообразование не происходит, но в то же время период экспозиции клеток в гипертонической среде минимален.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что фактор дегидратации играет ведущую роль в повреждении гормонопродуцирующей функции клеток Лейдига при скорости охлаждения 1 град/мин. Следует учитывать и факт цитотоксичности ДМСО, продолжительность контакта ТС с которым возрастает при медленном замораживании. При сокращении времени эквилибрации клеток в гиперосмотических условиях со скоростью охлаждения 5 град/мин не только увеличивается число жизнеспособных клеток, но и возникает феномен возрастания стимулированной гормональной секреции.

Мы также криоконсервировали суспензию клеток семенников, обогащенную клетками Лейдига. Это связано с тем, что использование клеток для трансплантации более уместно, так как позволяет, с одной стороны, упростить эту процедуру, а с другой – избавиться от большого количества высокоиммуногенных клеток герминативного эпителия. Ранее для криоконсервирования клеток Лейдига использовали охлаждение со скоростью 1 град/мин [20, 40]. Мы разработали программу криоконсервирования суспензии клеток семенников (СКС), которая включала программное снятие переохлаждения, высокие скорости охлаждения (15–20 град/мин) в температурных интервалах кристаллизации биологической системы (до –40°С) и диапазоне субэвтектических температур растворов ДМСО (от –40 до –70°С), что позволило увеличить жизнеспособность и сохранность тестостерон-продуцирующих клеток в СКС (рис. 14).

Криоконсервированные клетки/ткань семенников могут быть применены для восстановления стероидогенеза при гетеротопической трансплантации. Например, установлено, что на 50-е сутки после изотрансплантации фрагментов семенников, криоконсервированных с использованием скорости охлаждения 0,3 град/мин до –40°С на первом этапе и 10 град/мин до –140°С на втором в присутствии 1,5 М ДМСО, уровень тестостерона в плазме крови животных с криоконсервированными трансплантатами приближался к значениям, полученным для незамороженных образцов. Интересно, что увеличение массы семенных пузырьков коррелировала с повышением гормонального уровня в экспериментальных группах животных [37].

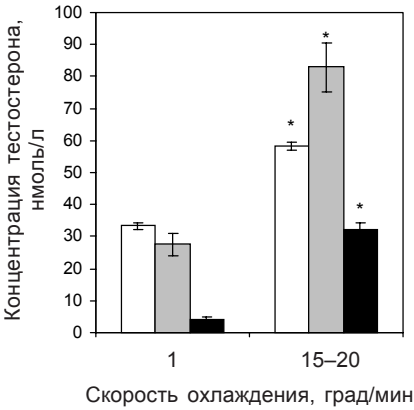


Рис. 14. Сохранность СКС, полученных из ТС, криоконсервированных со скоростью охлаждения 1 и 15–20 град/мин (□ – общая сохранность, ▨ – сохранность ГСД$^+$-клеток, ■ – сохранность НК$^+$-клеток; * – различия достоверны относительно 1 град/мин, $p < 0{,}05$).

Жизнеспособность изографтов криоконсервированных крысиных клеток Лейдига, трансплантированных под капсулу почки, была подтверждена позитивной реакцией на 3β-ГСД – основного фермента синтеза стероидных гормонов [17].

Результатом трансплантации СКС было существенное увеличение уровня тестостерона в крови по сравнению с животными без трансплантации. Через месяц после аллотрансплантации нативных и криоконсервированных СКС концентрация тестостерона крови составила 0,93–0,14 и 0,75–0,06 нмоль/л соответственно (рис. 15).

Сравнивая скорости самостоятельного восстановления уровня тестостерона крови и его восстановления после трансплантации СКС, мы сделали следующее заключение. В первом случае через

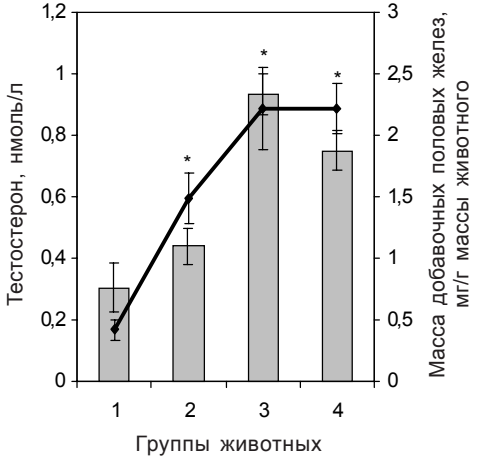


Рис. 15. Изменения уровня тестостерона крови и увеличение массы добавочных половых желез после трансплантации СКС у животных с экспериментальным токсическим гипогонадизмом: 1 – на момент трансплантации; 2 – без трансплантации; 3 – с трансплантацией нативной СКС; 4 – с трансплантацией криоконсервированной СКС (▭ – тестостерон в крови, —⁻— масса добавочных половых желез; * – различия достоверны относительно данных, полученных для животных без трансплантации, $p < 0,05$).

месяц уровень тестостерона повысился на 0,15 нмоль/л, а во втором – на 0,45–0,63 нмоль/л (рис. 15). Это свидетельствует о том, что при трансплантации СКС уровень тестостерона в крови животных компенсируется в 3–4 раза эффективней.

Некоторые различия способности свежевыделенной и криоконсервированной СКС восстанавливать уровень тестостерона, вероятно, связаны с элиминацией части 3β-ГСД$^+$-клеток в процессе криоконсервирования. Однако способность криоконсервированных клеток восстанавливать содержание тестостерона в крови и массу добавочных половых желез оставалась на достаточно высоком уровне.

При спонтанном восстановлении добавочных половых желез в течение 2-х месяцев после индукции гипогонадизма $CdCl_2$ их масса составила 1,49 ± 0,2 мг/г массы животного (рис. 16).

При трансплантации как свежевыделенной, так и криоконсервированной СКС масса добавочных половых желез составила около 2,22 ± 0,33 мг/г массы животного. Этот показатель был почти в 2 раза больше по сравнению с таковым у животных без трансплантации и достоверно не отличался от интактного контроля.

Рис. 16. Добавочные половые железы экспериментальных животных: 1 – контроль; 2 – экспериментальный токсический гипогонадизм через 2 месяца после введения хлорида кадмия и трансплантации СКС; 3 – экспериментальный токсический гипогонадизм через 2 месяца после введения хлорида кадмия без трансплантации.

Таким образом, трансплантация криоконсервированных фрагментов ткани и суспензии клеток семенников, обогащенной клетками Лейдига, позволяет осуществить адекватную коррекцию андроген-дефицитного состояния, вызванного токсическим поражением яичек.

3. Комбинированная трансплантация криоконсервированной ткани эндокринных желез

В настоящее время активно ведется поиск новых подходов пролонгирования сроков выживания трансплантата путем создания оптимального микроокружения для максимальной эффективности его функционирования. Одним из таких подходов является комбинированная трансплантация, то есть трансплантация двух и более видов ткани или клеток. Исследования, которые проводятся в этом направлении, можно разделить на те, при которых путем комбинированной трансплантации достигается иммунопротекция трансплантата, и те, при которых котрансплантация выполняется для улучшения трофической поддержки трансплантата, так как при гетеротопической трансплантации одним из факторов, снижающих приживление трансплантата, является недостаток поступления питательных веществ и притока обогащенной кислородом крови.

Комбинированная трансплантация эндокринных тканей представляет собой наиболее физиологичный подход для лечения таких синдромов, как адреналовая недостаточность, диабет или гипо-

паратироидизм. Особенно актуально применение этого метода при лечении множественных нарушений нейрогуморальной регуляции эндокринных функций и полиэндокринопатии.

Известно, что кора НЖ, кроме других гормонов, секретирует также глюкокортикоиды, которые обладают иммуносупрессивным действием. Кортизол и его синтетические аналоги широко используются в трансплантологии для угнетения реакций отторжения. Учитывая данное свойство НЖ, мы проведели эксперименты по трансплантации ткани НЖ в комбинации с тканью ЩЖ под капсулу почки животных-реципиентов. Контролем служили неоперированные животные.

Наиболее высокие показатели уровня Т4 в плазме крови крыс на 30 сутки после комбинированной трансплантации с НЖ наблюдались у реципиентов нативных фрагментов ЩЖ (рис. 17). Уровень Т4 после комбинированной трансплантации совместно культивированных тканей ЩЖ и НЖ составлял 55% от контроля.

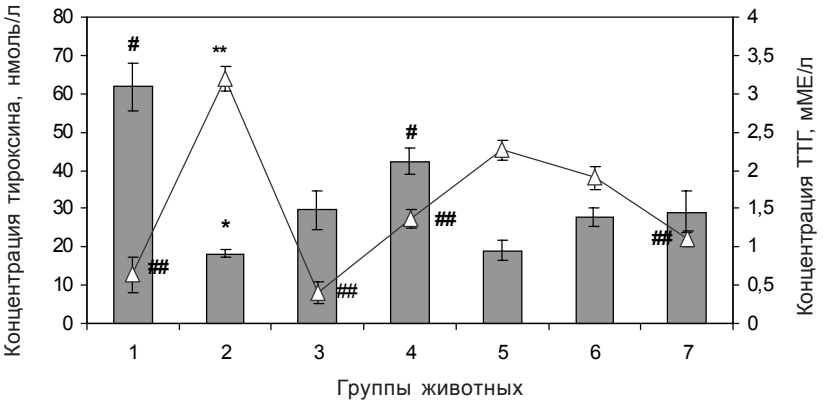


Рис. 17. Уровни Т4 и ТТГ в плазме крови крыс с трансплантацией ЩЖ в комбинации с НЖ: 1 – контроль; 2 – тиреоидэктомия; 3 – аутологичные фрагменты ЩЖ; 4 – фрагменты ЩЖ новорожденных поросят; 5 – культивированные фрагменты ЩЖ новорожденных поросят; 6 – криоконсервированные и рекультивированные фрагменты ЩЖ новорожденных поросят (▢ – Т4; — – ТТГ; *, # – различия значений Т4 и ТТГ достоверны по сравнению с тиреоидэктомией соответственно, $p<0,05$).

Криоконсервированные трансплантаты характеризовались меньшей гормональной активностью, что подтверждалось уровнем ТТГ в исследованных группах.

Еще более высокие показатели уровня Т4 наблюдались у крыс с комбинированной трансплантацией нативных фрагментов ЩЖ и НЖ новорожденных поросят (в среднем 80% от контроля), при этом содержание Т4 было на 39% выше, чем при монотрансплантации. Вероятно, данный факт можно трактовать в пользу иммунологической протекции трансплантата ЩЖ тканью НЖ, продуцирующей иммуносупрессорные гормоны.

Сопутствующим трансплантатом с иммунопротекторными свойствами, который наиболее часто используется при комбинированной трансплантации, являются клетки Сертоли семенников. Доказано, что эти клетки обладают способностью ингибировать пролиферацию активированных В- и Т-лимфоцитов и вызывать их апоптоз [23]. Ранее была показана долгосрочная выживаемость (больше 90 суток) клеток Сертоли новорожденных поросят, трансплантированных крысам под капсулу почки без иммуносупрессии [22]. Исходя из данных соображений, мы изучили влияние комбинированной трансплантации ткани ЩЖ и семенника на уровень Т4.

На 120-е сутки после комбинированной трансплантации ЩЖ и органотипической культуры семенников (ОКС) уровень Т4 в крови крыс всех экспериментальных групп находился в пределах от 32,69 ± 2,46 до 37,81 ± 2,83 нмоль/л (61–71% от контрольных значений). У тиреоидэктомированных крыс в крови также был обнаружен Т4 в концентрации 21,49 ± 4,11 нмоль/л (40% от контрольных значений), что свидетельствовало о частичной регенерации функции ЩЖ после тиреоидэктомии (рис. 18).

Использование гипофиза – «универсального менеджера» эндокринной системы – имеет значительные преимущества в случае комбинированной трансплантации. Специфическая регуляция гормональной функции с помощью тропных гормонов может значительно улучшить выживаемость трансплантата эндокринных желез. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экс-

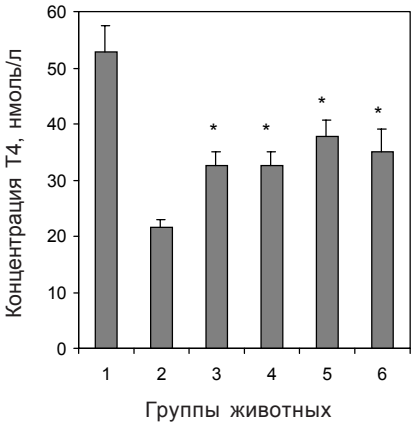


Рис. 18. Уровень Т4 в плазме крови крыс: 1 – неоперированных (контроль); 2 – тиреоидэктомированных; и с ксенотрансплантацией: 3 – нативных фрагментов ЩЖ и семенников; 4 – культуры ткани ЩЖ и семенников; 5 – криоконсервированной культуры ткани ЩЖ и ОКС; 6 – криоконсервированных и рекультивированных ОКЩЖ и семенников (* – различия значений Т4 достоверны по сравнению с тиреоидэктомией, $p < 0{,}05$).

плантат гипофиза, трансплантированный совместно с тканью НЖ, стимулирует трансплантат, что выражается в повышении секреции кортизола по сравнению с монотрансплантатом (рис. 19).

Эффективность комбинированной трансплантации была показана и в случае применения криоконсервированных тестикулярных трансплантатов. При комбинированной трансплантации ткани семенников и эксплантата гипофиза уровень тестостерона и масса добавочных половых желез реципиентов увеличивались по сравнению с монотрансплантацией (рис. 20).

Предтрансплантационная обработка ткани экстрактом гипофиза или совместное культивирование с эксплантатом гипофиза крайне важны для эффективного функционирования гормонопродуцирующего трансплантата. В наших экспериментах комбинированная аллотрансплантация фрагментов ЩЖ с гипофизом не дала существенного увеличения уровня Т4, как и комбинированная трансплантация отдельно культивированных фрагментов ЩЖ с эксплантатами гипофиза (рис. 21). Однако трансплантация совместно культивированных тканей обусловила выраженное повышение Т4 в плазме крови крыс по сравнению с группой тиреоидэктомированных животных. Возможно, это связано как с влиянием ТТГ на пролиферацию тиреоидной паренхимы в культуре (такой

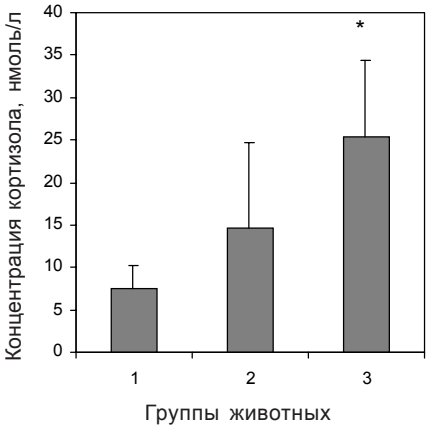


Рис. 19. Изменение содержания кортизола в плазме крови крыс на 20 сутки после трансплантации: 1 – адреналэктомия; 2 – органотипическая культура адренокортекса; 3 – органотипическая культура адренокортекса + эксплантат гипофиза (* – значения кортизола достоверны по сравнению с адреналэктомией, $p < 0{,}05$).

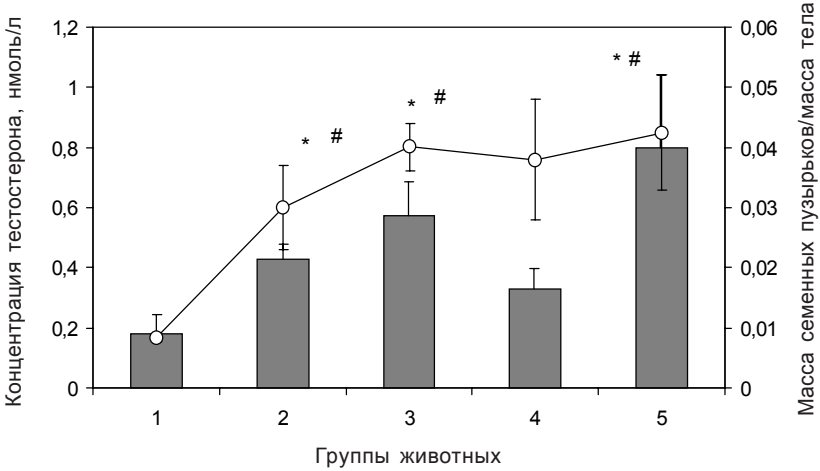


Рис. 20. Масса семенных пузырьков и содержание тестостерона в крови крыс: 1 – орхиэктомированных и с ксенотрансплантацией: 2 – криоконсервированной культуры ткани семенников; 3 – криоконсервированной культуры ткани семенников + эксплантат гипофиза; 4 – криоконсервированной и рекультивированной ткани семенников; 5 – криоконсервированной и рекультивированной ткани семенников + эксплантат гипофиза (▢ – тестостерон, —⁻— семенные пузырьки; *, # – различия содержания тестостерона и массы семенных пузырьков достоверны относительно данных орхиэктомии соответственно, $p < 0{,}05$).

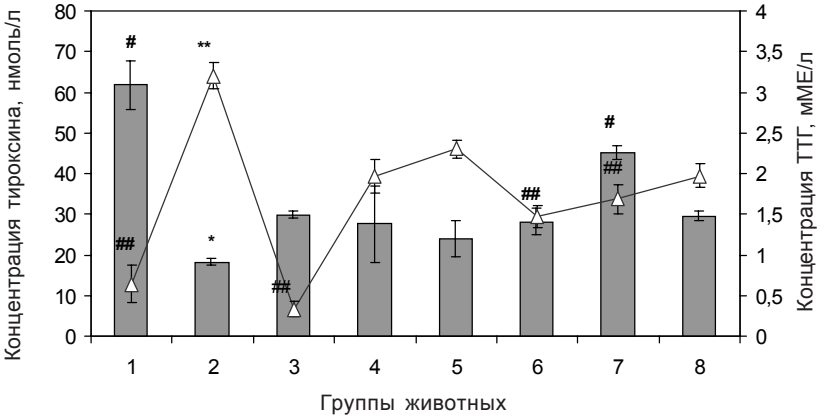


Рис. 21. Уровни Т4 и ТТГ в плазме крови животных: 1 – контрольных; 2 – тиреоидэктомированных; 3 – с аллотрансплантацией нативных фрагментов ЩЖ; 4 – нативных фрагментов ЩЖ и гипофиза; 5 – раздельно культивированной ткани ЩЖ и эксплантатов гипофиза; 6 – совместно культивированной ткани ЩЖ и эксплантатов гипофиза; 7 – с ксенотрансплантацией раздельно культивированной ткани ЩЖ и эксплантатов гипофиза; 8 – совместно культивированной ткани ЩЖ и эксплантатов гипофиза (8) (▭ – Т4, ⎯ – ТТГ; *, ** – p <0,05 по отношению к контролю; #, ## – p < 0,05 по сравнению с тиреоидэктомией).

материал более функционально активен), так и с местной стимуляцией трансплантата ЩЖ *in vivo*.

В ксеногенной системе к данному сроку наблюдения уровень Т4 не был увеличен, что, вероятно, объясняется ускорением посттрансплантационных иммунных процессов, деструкцией и некрозом трансплантата вследствие высокой иммуногенности ксеноматериала. Однако определяется тенденция к увеличению уровня Т4 после комбинированной трансплантации совместно культивированных тканей ЩЖ и гипофиза, как и в случае аллотрансплантации.

Уровень тиреотропного гормона гипофиза во всех экспериментальных группах зависит от уровня тироксина, что может свидетельствовать о функционировании трансплантата в пределах гипофизарно-тиреоидной системы реципиента.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что при комбинированной трансплантации криоконсервированной ткани эндокринных желез улучшаются гормональные свойства трансплантата и интеграция в гипоталамо-гипофизарно-эффекторную ось, а также пролонгируется его выживаемость в организме реципиента.

4. Коррекция состояния экспериментальных животных с моделью бронхиальной астмы путем трансплантации органотипической культуры надпочечниковых желез

Распространенность и анализ заболеваемости бронхиальной астмы (БА) свидетельствуют о том, что в настоящее время этой патологией страдают от 20 до 40% населения, а среди хронических заболеваний у детей данная патология занимает первое место. В основе лечения бронхиальной астмы лежит использование разнообразных препаратов, среди которых основная роль принадлежит кортикостероидам и бронхолитическим средствам. Из последних наиболее эффективными являются β-агонисты, однако они не предотвращают ни позднюю астматическую реакцию после аллергенной провокации, ни последующее развитие бронхиальной гиперреактивности, а при длительном приеме они не только не снижают бронхиальную реактивность, а могут даже ее усилить. Наиболее эффективными противовоспалительными препаратами для лечения БА являются кортикостероиды, однако использование гормонов часто приводит к развитию побочных эффектов, в частности к вторичной хронической надпочечниковой недостаточности, поэтому поиск альтернативных способов введения глюкокортикоидов особенно важен.

В медицинской практике все большее применение находит клеточная и органная терапия, позволяющая восстановить гормональный гомеостаз посредством интеграции трансплантата в нейроэндокринную систему реципиента в качестве функционального звена, подчиняющегося принципу обратной связи. Альтернативным методом гормонотерапии может быть трансплантация органоти-

пической культуры надпочечников (ОКНП), которая позволяет создать в организме реципиента функционирующее депо кортикостероидов.

В наших экспериментах была создана модель БА. Исследование экспериментальной аллергической реакции замедленного типа проводили при сенсибилизации овальбумином (ОВА) крыс и морских свинок. Дозу аллергена для первичной сенсибилизации подбирали на крысах. Для этого животным дважды на 1 и 7 сутки внутрибрюшинно вводили раствор ОВА, содержащий 100 мг $Al(OH)_3$, – по 10 и 100 мкг/100г веса животного, соответственно. На 21 сутки проводили вторичную ингаляционную сенсибилизацию 0,5 или 1% ОВА. Для этого животных помещали в плексигласовый бокс (30×15×20), соединенный с ультрасоническим небулайзером «Spira» в течение 15 мин. Признаки аллергического воспаления купировали 2-кратным внутримышечным введением дексаметазона в дозе 20 и 40 мкг/кг за 24 и 1 ч до начала вторичной сенсибилизации соответственно.

У животных с моделью БА наблюдалось достоверное снижение уровня глюкокортикоидов по сравнению с контролем, что согласуется с литературными данными о том, что у больных БА отмечается низкий уровень свободных стероидных гормонов в плазме крови [24]. После введения как дексаметазона, так и криоконсервированной ОКНП гормональный уровень у животных восстанавливался и достоверно не отличался такового в плазме крови интактных животных (рис. 22). Полученные в экспериментах результаты свидетельствовали о большей эффективности криоконсервированных трансплантатов.

Увеличение дозы криоконсервированной культуры при трансплантации позволяет компенсировать снижение уровня глюкокортикоидов в плазме крови морских свинок, характерное для аллергического воспаления, и может быть альтернативой дексаметазоновой терапии, поскольку изменения были аналогичными при проведении гормональной терапии.

При изучении клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа у морских свинок с БА до и после лечения было установлено, что

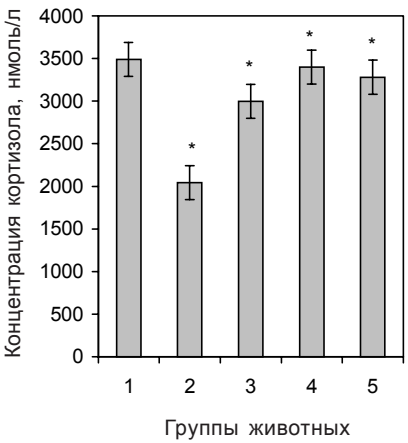


Рис. 22. Уровень глюкокортикоидов в плазме крови морских свинок через 24 ч после вторичной ингаляционной сенсибилизации: 1 – контроль; 2 – ОВА-сенсибилизированные; 3 – ОВА-сенсибилизированные с трансплантацией криоконсервированной ОКНП (1 доза на 100 г массы); 4 – ОВА-сенсибилизированные с трансплантацией ОКНП (2 дозы на 100 г массы); 5 – ОВА-сенсибилизированные с внутримышечным введением дексаметазона в концентрации 40 мг/кг (* – различия достоверны относительно контрольной группы животных, $p < 0{,}05$).

максимальное количество клеток в бронхоальвеолярном лаваже отмечалось у животных, которых не лечили. Трансплантация увеличенной дозы криоконсервированной культуры и введение дексаметазона позволили снизить общее количество клеток в 2 раза, однако этот показатель оставался достоверно выше, чем у контрольных животных [12].

Одним из характерных признаков БА является десквамация эпителия дыхательных путей с обтурацией просвета бронхов слизистыми пробками с примесью эозинофилов. Эпителиальные повреждения могут быть следствием высвобождения из гранул эозинофилов катионных белков [19]. При анализе относительного содержания катионного белка в цитоплазме эозинофилов (рис. 23) установлено, что максимальное содержание катионного белка наблюдается в гранулах эозинофилов контрольной группы животных, минимальное – в группе животных с моделью БА. При введении дексаметазона содержание исследуемого параметра сопоставимо с контрольной группой, что, вероятно, связано со снижением активности рецепторов эозинофилов при взаимодействии с кортикостероидами.

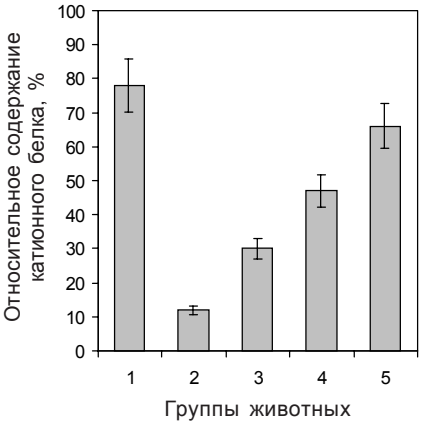


Рис. 23. Относительное содержание катионного белка в цитоплазме эозинофилов морских свинок через 24 ч после вторичной ингаляционной сенсибилизации: 1 – контроль; 2 – ОВА-сенсибилизированные; 3 – ОВА-сенсибилизированные с трансплантацией криоконсервированной ОКНП (1 доза на 100 г массы); 4 – ОВА-сенсибилизированные с трансплантацией ОКНП (2 дозы); 5 – ОВА-сенсибилизированные с внутримышечным введением дексаметазона (40 мг/кг) (* – различия достоверны относительно контрольной группы животных, $p < 0,05$).

При трансплантации увеличенной дозы криоконсервированного материала содержание катионных белков в цитоплазме эозинофилов было достоверно выше по сравнению с группой животных с моделью БА.

Для более полной картины влияния трансплантации на процессы аллергического воспаления был проведен сравнительный гистологический анализ тканей легких животных с моделью БА до и после проведенной терапии. У животных с БА изменяется морфология бронхов. Мерцательный респираторный эпителий теряет реснички, нарушается целостность эпителиальной выстилки, наблюдаются гипертрофия подслизистого слоя и эозинофильная инфильтрация тканей дыхательных путей, сопровождающаяся признаками повышенной проницаемости сосудов, при которой эффекторные клетки выходят в просвет бронхов и появляются четко выраженные слизистые пробки в просветах бронхов, являющиеся характерными признаками БА. При введении дексаметазона и трансплантации на гистологических срезах легких слизистые пробки в просветах бронхов не выявлены. Однако после проведенного лечения слизистая оболочка бронхов имеет гладкую структуру в отличие от контроля, в котором она имеет ярко выраженный

складчатый характер. Можно отметить уменьшение инфильтрации тканей дыхательных путей эозинофилами, отсутствие утолщения базальной мембраны. В норме толщина базальной мембраны составляет 7 мкм, при бронхиальной астме она утолщается до 10–30 мкм. Отсутствие утолщений базальной мембраны может свидетельствовать о восстановлении тканей при проведенных способах лечения экспериментальных животных.

На основе сравнительного анализа гистологических препаратов тканей дыхательных путей можно предположить, что трансплантация криоконсервированной ОКНП оказывает действие, сравнимое с дексаметазоновой терапией. В обоих случаях структура патологической ткани после проведенного лечения полностью не восстанавливалась.

Кратко характеризуя дальнейшие перспективы развития эндокринной трансплантологии, можно выделить два направления: 1) поиск путей преодоления иммунологического барьера гистосовместимости и индукции толерантности на уровне организма; 2) поиск прогениторных клеток, способных дифференцироваться в эндокринные.

Принципиально новый подход к созданию пожизненного заместительного эндокринного трансплантата возможен лишь на основе комбинирования этих двух направлений.

Существование недифференцированных клеток-предшественников в эндокринных железах, осуществляющих регенерацию клеточной популяции железы на протяжении жизни, в настоящее время подкрепляется фактическим материалом. Обеспечивая необходимое микроокружение для таких клеток, что возможно при эктопической пересадке, либо трансплантируя их гетеротопически совместно с гормонопродуцирующими клетками, можно добиться полной репарации утраченной эндокринной функции.

Выделение стволовых клеток-предшественников, очистка их от контаминирующих популяций, подбор условий их пролиферации и дифференцировки, трансплантация в условиях индукции толерантности – будущее эндокринной трансплантологии.

Литература

1. Божок Г.А., Алабедалькарім Н.М., Легач Є.І. Бондаренко Т.П. Вплив кріоконсервування на імунобіологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації // Трансплантологія. – 2004. – Т. 5, №1. – С. 88–92.
2. Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Секретирующая способность адренокортикальной ткани новорожденных и половозрелых свиней при действии низких температур // Проблемы криобиологии. – 1998. – №2. – С. 50–54.
3. Гладкова А.И., Бондаренко Л.А., Даценко Б.М. Аллотрансплантация свежезаготовленных и криоконсервированных семенников половозрелых и неполовозрелых животных // Тезисы докладов Международной конференции «Криоконсервирование клеток и тканей». – Харьков, 1989. – С. 127–135.
4. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – Киев: Наук. думка, 1993. – 241 с.
5. Дедов И.И., Фадеев В.В., Мельниченко Г.А. Недостаточность надпочечников. – Москва, 2002. – 320 с.
6. Карпенко Л.Г., Губина Н.Ф., Щирова В.А. Активность аденилатциклазы в плазматических мембранах тироцитов и кортикоцитов после действия замораживания и ДМСО // Проблемы криобиологии. – 2000. – №2. – С. 58–63.
7. Легач Е.И. Синтез кортизола тканевыми и клеточными культурами коры надпочечных желез новорожденных и половозрелых свиней // Проблемы криобиологии. – 1997. – №3. – С. 63–65.
8. Легач Е.И., Чуйко В.А., Бондарева И.М. Влияние димексида и пропандиола на освобождение кортизола срезами адренокортикальной ткани и ее чувствительность к действию стимуляторов // Проблемы криобиологии. – 1997. – №4. – С. 37–41.
9. Луговой С.В., Бондаренко Т.П., Гурина Т.М., Глушко Т.А. Влияние режимов замораживания на морфологические характеристики органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят // Проблемы эндокринной патологии. – 2003. – №3. – С. 77–82.
10. Петунина Н.А. Субклинический гипотиреоз: подходы к диагностике и лечению // Трудный пациент. – 2006. – Т.4, №2. – С. 30–35.
11. Рашитов М.М., Норбоев А.А. Аллотрансплантация криоконсервированной ткани надпочечных желез у больных с хронической недостаточностью коры надпочечников // Вестник врача общей практики. – 2001. – №2. – С. 12–18.
12. Самченко И.И., Кирошка В.В., Сирота В.В. и др. Состояние гиперреактивности дыхательных путей морских свинок с моделью бронхиальной астмы при трансплантации органной культуры надпочечников // Биологический вестник. – 2007. – Т. 1, №1. – С. 67–72.
13. Туракулов Я.Х., Гуссаковский Е.Е., Исмаилов С.И., Налбандян А.А. Влияние криоконсервации тиреоидной паренхимы на йодаминокислотный состав тиреоглобулина и его йодирование // Проблемы эндокринологии. – 1985. – Т. 31, №1. – С. 29–31.
14. Турчин І.С., Ларін О.С., Дроздович І.І. та ін. Застосування комбінованих органних культур ендокринних залоз для лікування ендокринопатій: досягнення та перспектива // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 293–295.
15. Чуйко В.А., Карпенко Л.Г., Иванова Е.И. и др. Криоконсервация коры надпочечников // Проблемы криобиологии. – 1995. – №1. – С. 47–51.
16. Almeida H., Ferreira J., Neves D. Macrophages of the adrenal cortex: a morphological study of the effects of aging and dexamethasone administration // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2004. – Vol. 1019. – P. 135–140.
17. Barzilai D., Dickstein G., Kanter Y. et al. Complete remission of Cushing's disease by total bilateral adrenalectomy and adrenal autotransplantation // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1980. – Vol. 50, №5. – P. 853–856.
18. Benton L., Shan L.X., Hardy M.P. Differentiation of adult Leydig cells // J Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1995. – Vol. 53, №1–6. – P. 61–68.

19. Berman J.S., Weller P.F. Airway eosinophils and lymphocytes in asthma // Am. Rev. Respir. Dis. – 1992. – Vol. 145, №6. – P. 1246–1248.
20. Chen N., Gao Q., Field E.H. Prevention of Th1 responses is critical for tolerance // Transplantation. – 1996. – Vol. 61, №7. – P. 1076–1083.
21. Di Blasio A.M., Fujii D.K., Yamamoto M. et al. Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotropic hormone: rationalization of in vitro and in vivo findings // Biol. Reprod. – 1990. – Vol. 42, №4. – P. 683–691.
22. Dufour J.M., Gores P., Hemendinger R. et al. Transgenic Sertoli cells as a vehicle for gene therapy // Cell Transplantation. – 2004. – Vol. 13, №1. – P. 1–6.
23. Emerich D.F., Hemendinger R., Halberstadt C. R. The Testicular Derived Sertoli Cell: Cellular immunoscience to enable transplantation // Cell Transplant. – 2003. – Vol. 12, №4. – P.335–349.
24. Gibson P.G., Saltos N., Borgas T. Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid–treated asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2000. – Vol. 105, №4. – P. 752–759.
25. Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets // The Journal of Cell Biology. – 1985. – Vol. 100. – P. 965–973.
26. Jezek D., Schulze W., Kalanj-Bognar S. Effects of various cryopreservation media and freezing–thawing on the morphology of rat testicular biopsies // Andrologia. – 2001. – Vol. 33, №6. – P. 368–378.
27. Karpenko L.G., Gubina N.F., Schirova V.A. et al. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex // CryoLetters. – 2001. – Vol. 22, №4. – P. 229–234.
28. Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20, №6. – P. 1676–1687.
29. Ketheesan N., Kearney J.N., Ingham E. The effect of cryopreservation on the immunogenicity of allogeneic cardiac valves // Cryobiology. – 1996. – Vol. 33, №1. – P. 41–53.
30. Kitamura Y., Shimizu K., Nagahama M. et al. Cryopreservation of thyroid pieces – optimal freezing condition and recovery // Nippon Geka Gakkai Zasshi. – 1994. – Vol. 95, №1. – P. 14–20.
31. Mazur P., Karow A.M., Pegg D.E. Organ preservation for transplantation. – New York: Bassel, 1981. – P. 143–176.
32. Metzger R., Mempel T., Joppich I., Till H. Organ-specific distribution of major histocompatibility antigens in rats // Pediatr. Surg. Int. – 2000. – Vol. 16, №4. – P. 285–292.
33. Okamoto T., Fujimoto Y., Obara T. et al. Trial of thyroid autotransplantation in patients with Graves' disease whose remnant thyroid has unintentionally been made too small at subtotal thyroidectomy // Endocrin. Jpn. – 1990. – Vol. 37, №1. – P. 95–101.
34. Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D. et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs // Science. – 2003. – Vol. 17, №299. – P. 411–414.
35. Roglic G., Unwin N., Bennett H.P. et al. The burden of mortality attributable to diabetes // Diabetes Care. – 2005. – Vol. 25, №9. – P. 2130–2135.
36. Sato T. Class II MHC-expressing cells in the rat adrenal gland defined by monoclonal antibodies // Histochem. Cell. Biol. – 1998. – Vol. 109, №4. – P. 359–367.
37. Schlatt S., Kim S.S., Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts // Reproduction. – 2002. – Vol. 124, №3. – P. 339–346.
38. Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan T. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regime // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 27, №343(4). – P. 230–238.
39. Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // Brain Res. – 1988. – Vol. 28, №454 (1–2). – P. 383–386.

40. Tai J., Tze W.J., Johnson H.W. Cryopreservation of rat Leydig cells for in vitro and in vivo studies // Horm. Metab. Res. – 1994. – Vol. 26, №3. – P. 145–147.
41. Tanaka-Matsuura L.M., Werner R.S., Farah C.S., Romaldini J.H. Cryopreserved human thyroid tissue for TSAb determination: comparison with fresh tissue // Horm. Res. – 1984. – Vol. 20. – №2. – P. 124–128.
42. Taylor M.J., Bank H.L. Function of lymphocytes and macrophages after cryopreservation by procedures for pancreatic islets: potential for reducing tissue immunogenicity // Cryobiology. – 1988. – Vol. 25, №1. – P. 1–17.
43. Taylor M.J., London N.J., Thirdborough S.M. et al. The cryobiology of rat and human dendritic cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing // Cryobiology. – 1990. – Vol. 27, №3. – P. 269–278.
44. Thusoo T.K., Das D. Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue // J. Am.Coll. Surg. – 2003. – Vol. 196, №4. – P. 663–664.
45. Till H., Stachel D., Muller-Hocker J. et al. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats // Eur. J. Pediatr. Surg. – 1998. – Vol. 8, №4. – P. 240–243.

Криоконсервирование промышленных и коллекционных штаммов микроорганизмов

И.П. Высеканцев, В.Ф. Марценюк*,
А.Е. Ананьина, О.М. Бабинец, А.Ю. Артуянц

Отдел долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах и криомикробиологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: martsenyuk@ukr.net*

Микроорганизмы играют важную роль в современных биотехнологических производствах. Применение микроорганизмов и продуктов их биосинтеза позволило решить ряд актуальных проблем в медицине, молекулярной биологии, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, в производстве высокотехнологичного оборудования и других сферах деятельности человека.

На разных этапах биотехнологических производств существует необходимость консервирования микроорганизмов. Законодательством большинства индустриально развитых государств предусмотрено обязательное депонирование в национальных или ведомственных коллекциях микроорганизмов штаммов-продуцентов, используемых в производствах или являющихся объектом изобретения или патента [23]. Перечень микроорганизмов, которые депонируют сегодня в коллекциях мира, включает бактерии, грибы, микроскопические водоросли, дрожжи, вирусы растений и животных, фаги, плазмиды (изолированные и в микробных клетках), простейшие, РНК и ДНК микроорганизмов, нуклеотидные последовательности [63]. Процедура депонирова-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 401–440.
© И.П. Высеканцев, В.Ф. Марценюк, А.Е. Ананьина и др., 2012

ния микроорганизма в обязательном порядке предусматривает долгосрочную гарантированную сохранность жизнеспособности и генетических структур, микробиологическую чистоту хранящихся образцов. В связи с этим в практике банков и при создании коллекций используют не менее двух методов консервирования одного микроорганизма, чтобы исключить потерю или контаминацию хранящегося штамма. Известно большое количество способов консервирования микроорганизмов – хранение под минеральным маслом с периодическими пересевами, высушивание в воздухе на различных носителях, L-высушивание, тепловое высушивание, лиофилизация, хранение при умеренно низких температурах, криоконсервирование [25, 36, 41, 45–47, 57, 61]. Для решения частных задач в практике банков и при создании коллекций микроорганизмов используют любой из перечисленных способов консервирования, но для долгосрочного хранения микроорганизмов, как правило, применяют лиофилизацию и криоконсервирование.

Непосредственно в биотехнологических производствах все чаще используют консервированный посевной материал, что позволяет его стандартизировать и хранить в необходимом для производства количестве, а также снизить риск контаминации продуцентов в рабочих ферментерах. Для хранения посевного материала используют различные низкие температуры [18].

Многочисленные исследования показывают, что криоконсервирование является наиболее надежным методом долгосрочного хранения различных микроорганизмов, обеспечивающим сохранность жизнеспособности и исходных биологических свойств [7, 18, 25, 42, 45–48, 61].

В Украине и СССР первые исследования по применению криоконсервированных микроорганизмов-продуцентов в биотехнологических производствах проводились под руководством профессора А.А. Цуцаевой. Был разработан ряд технологий криоконсервирования как коллекционных штаммов микроорганизмов, так и стартовых культур. Проведены успешные промышленные испытания использования криоконсервированного посевного материала на предприятиях медицинской и микробиологической промышленности. В Специальном конструкторско-техническом бюро с опытным производством ИПКиК НАН Украины была разработана

и испытана на предприятиях микробиологической промышленности аппаратура для криоконсервирования коллекционных штаммов и посевного материала. Итоги первых опытов применения криоконсервирования микроорганизмов в биотехнологических производствах представлены в соответствующих монографиях [17, 28].

Известно, что на исходную криорезистентность клеточных форм микроорганизмов могут влиять особенности строения и физиологии клеток, обусловленные принадлежностью к определенному таксону, возрастом микробной культуры, стадией клеточного цикла, составом ростовой среды, условиями культивирования (аэрация, температура, pH среды, концентрация метаболитов и др.). На сохранность микробных клеток в процессе криоконсервирования влияют исходная концентрация клеток, состав среды консервирования, режимы охлаждения-отогрева, на сохранность вирусов – ультраструктурная организация, состав среды консервирования и режимы охлаждения-отогрева [25, 28, 41, 42, 45–47].

Унифицированных методов криоконсервирования для разных семейств и родов микроорганизмов не существует. Учитывая количество факторов, влияющих на исходную резистентность, в большинстве случаев необходимо разрабатывать индивидуальные протоколы криоконсервирования. Для некоторых видов микроорганизмов и коммерческих препаратов такие протоколы отсутствуют или проведены лишь фрагментарные исследования. В данной главе представлены результаты опытов, посвященных криоконсервированию иммобилизованных микроорганизмов, аспорогенных анаэробных бактерий и дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

При оценке эффективности криоконсервирования отдельных клеток микроорганизмов мы использовали термин «жизнеспособность» – сохранение микробной клеткой способности к делению и образованию макроколоний после посева на агаризованную среду [20]. В данном случае макроколония образуется дочерними клетками – потомками одной исходной клетки.

В экспериментах с иммобилизованными на сорбентах клетками использовали термин «сохранность» – образование макроколоний в агаризованной среде комплексами «носитель-клетки». В этом случае макроколония образуется при делении нескольких клеток, находящихся на поверхности носителя.

Криоконсервирование иммобилизованных микроорганизмов

Благодаря значительному количеству положительных качеств иммобилизованные клетки-продуценты часто используются в производственных схемах биотехнологий [11, 26]. Возрос интерес к использованию иммобилизованных микроорганизмов и ферментов в медицине и ветеринарии [15, 16]. Предполагают, что препараты иммобилизованных микроорганизмов легче «транспортируются» в пораженные органы и ткани, и они более устойчивы к воздействию различных внутренних факторов макроорганизма. Кроме того, возможен более выраженный терапевтический эффект таких препаратов за счет синергического, симбиотического и пролонгирующего действия материала носителя.

Способы иммобилизации микроорганизмов условно разделяют на три группы [11, 15, 26]:

– на носителе, когда часть поверхности «омывает» внешняя среда, а потребление питательных субстратов и выделение продуктов жизнедеятельности определяется функциональной активностью клеток;

– в носителе, когда между клетками и средой находится слой материала носителя, а транспорт питательных субстратов и отведение метаболитов осуществляются через этот слой за счет диффузии, зависящей от пористости, заряда, гидрофильности носителя;

– с помощью мембранных технологий, когда клетки с незначительной частью внешней среды отделены от остальной среды полупроницаемой мембраной.

Большой интерес представляет проблема создания и применения препаратов иммобилизованных пробиотиков [16]. Микробиота человека состоит из микробиоценозов пищеварительного тракта, урогенитального тракта, носоглотки и дыхательных путей, кожи. Роль и функции микробиоценозов достаточно детально освещены в ряде публикаций [8, 10, 12, 13, 34, 43, 44].

Под влиянием различных факторов (ятрогенные воздействия, питание, соматические заболевания внутренних органов, стрессы и иммунодефицитные состояния различного генеза, физические и химические воздействия, инфекционные заболевания желудочно-

кишечного тракта и др.) у человека развивается дисбиоз кишечника – клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры, транслокацией различных ее представителей в несвойственные ей биотопы, метаболическими и иммунными нарушениями [12, 13]. Важным звеном в терапии дисбиоза является прием препаратов пробиотиков и энтеросорбентов [10, 12, 30].

Выделяют три группы пробиотических препаратов [19]:

– пробиотики – живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции хозяина путем восстановления его микробиоценозов;

– пребиотики – неперевариваемые ингредиенты, селективно стимулирующие рост и метаболическую активность одной или нескольких групп нормальной микрофлоры толстого кишечника;

– синбиотики – препараты, полученные в результате рациональной комбинации пре- и пробиотиков и оказывающие терапевтический эффект.

К энтеросорбентам относятся препараты пяти групп с различными физико-химическими свойствами [22].

Первые экспериментальные и технологические разработки по получению иммобилизованных пробиотических препаратов показали, что иммобилизация обеспечивает их сохранность, стабильность и высокую биологическую доступность [16]. Созданы первые препараты бифидобактерий и лактобактерий, иммобилизованных на углеродных энтеросорбентах [16, 31, 32].

Пробиотические препараты должны проявлять положительный эффект на организм пациента, подтвержденный в рандомизированных клинических исследованиях, не иметь патогенности и токсичности, обладать иммуномодулирующей способностью, не оказывать побочных эффектов при длительном применении, сохраняться в пищеварительном тракте до достижения максимального терапевтического эффекта [12].

Почти все препараты пробиотиков созданы на основе эубиотиков-бактерий. Наше исследование было проведено на дрожжах *Saccharomyces boulardii*, которые являются основой пробиотического препарата «Энтерол» («BioCodex», Франция). Препарат из

S. boulardii имеет две отличительные от бактериальных пробиотических препаратов особенности. Дрожжи *S. boulardii* устойчивы к антибактериальным препаратам, применяемым для лечения бактериальных инфекций. В связи с этим отмечен выраженный терапевтический эффект от использования препарата «Энтерол» в комплексном лечении острой и хронической диареи инфекционной этиологии, пептической язвы, ассоциированной с *Helicobacter pilori*, дисбиозов различной этиологии [29, 35]. Кроме того, особенностью *S. boulardii* является то, что они не имеют рецепторов, обеспечивающих адгезию к энтероцитам и колоноцитам, и вследствие этого не колонизируют кишечник человека. Дрожжевые клетки элиминируют из организма на 2–5 сутки после окончания приема препарата [35, 38]. С одной стороны, это положительная особенность, так как *S. boulardii* не является представителем микробиоценоза кишечника, с другой – это диктует необходимость проведения более длительных курсов терапии.

Нами была разработана методика иммобилизации клеток *S. boulardii* на различных сорбентах [6]. Наиболее высокие показатели адгезии при температуре 0...2°С получены в экспериментах с сорбентами «Сорбекс» и «СУМС-1».

Было проведено сравнительное изучение влияния условий криоконсервирования (состав среды консервирования и режим охлаждения) на жизнеспособность неиммобилизованных клеток *S. boulardii* и сохранность комплексов «носитель – иммобилизованные на его поверхности клетки» (далее «носитель-клетки»).

Установлено, что на жизнеспособность свободных клеток *S. boulardii* в процессе криоконсервирования оказывают значимое влияние скорость охлаждения и состав среды консервирования. Характер зависимости жизнеспособности этих клеток от скорости охлаждения и состава консервирующей среды отвечает положениям двухфакторной теории криоповреждений [45, 54–56]. Максимальную жизнеспособность клеток, не отличающуюся достоверно от исходной, при использовании в качестве среды криоконсервирования физиологического раствора, пивного сусла 8°Б, 5%-го раствора ДМСО, 5%-го раствора сахарозы наблюдали после замораживания со скоростью охлаждения 1 град/мин. После охлаждения со скоростями 5, 10, 15, 20, 40 град/мин количество

жизнеспособных клеток снижалось и достигало минимальных значений после замораживания погружением образцов в жидкий азот (рис. 1, А–В). При использовании в качестве среды консервирования 5%-го раствора сахарозы количество жизнеспособных клеток оставалось на исходном уровне после охлаждения со скоростями 1, 5, 10 град/мин (рис. 1, Г).

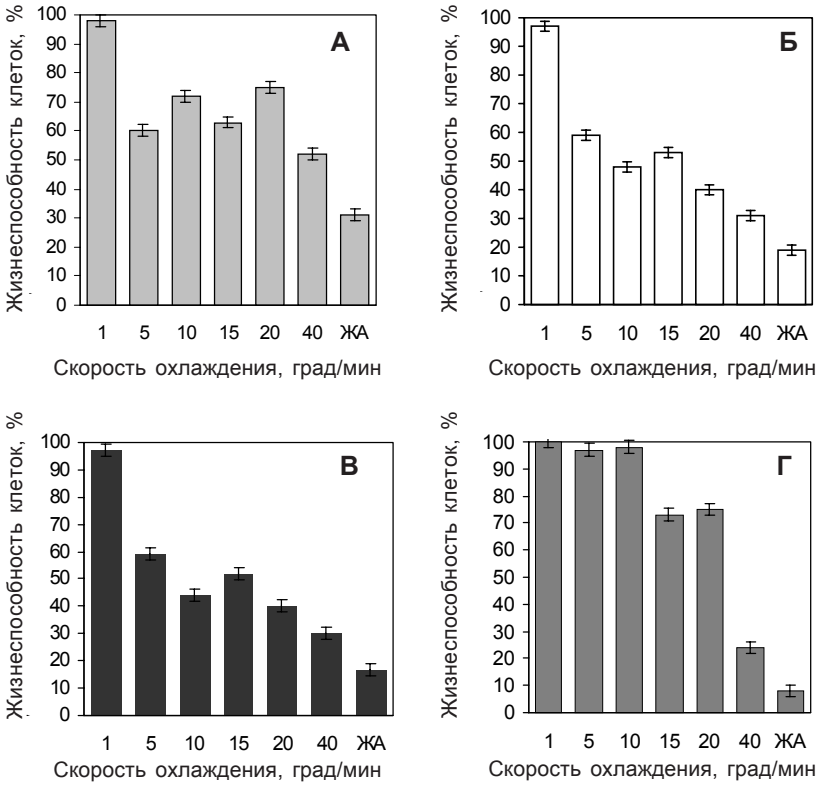


Рис. 1. Жизнеспособность свободных клеток дрожжей *S.boulardii* после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – в физиологическом растворе; Б – пивном сусле; В – 5%-м водном растворе ДМСО; Г – 5%-м водном растворе сахарозы; ЖА – погружение в жидкий азот.

В экспериментах по криоконсервированию иммобилизованных клеток *S. boulardii* было установлено, что сохранность комплексов «носитель-клетки» при всех режимах охлаждения и использованных составах сред консервирования значительно ниже, чем жизнеспособность свободных клеток. Максимальную сохранность комплексов во всех средах консервирования также обеспечивает охлаждение со скоростью 1 град/мин (рис. 2, 3). При этом режиме охлаждения сохранность комплексов составляет в зависимости от среды консервирования от 3,9 до 22,2%.

После охлаждения со скоростями 5–40 град/мин и погружения в жидкий азот сохранность комплексов достоверно снижалась до 0,7–10,3%.

После замораживания клеток *S.boulardii*, иммобилизованных на энтеросорбенте «Сорбекс», со скоростью 1 град/мин сохранность комплексов «носитель-клетки» составляла в зависимости от среды консервирования 25,3–80,5%. При повышении скорости охлаждения до 5–40 град/мин и замораживании образцов погружением в жидкий азот количество сохранившихся комплексов «носитель-клетки» достоверно снижалось до 2,6–6,1% (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сохранность клеток *S. boulardii*, иммобилизованных на энтеросорбентах, как и при замораживании клеточных суспензий, зависит от режима охлаждения, состава среды консервирования, строения и химического состава носителя. Максимальная сохранность комплексов «носитель-клетки» при изучавшихся режимах охлаждения выявлена после охлаждения со скоростью 1 град/мин. Однако количество колониеобразующих комплексов «носитель-клетки» после замораживания значительно снижается по сравнению с жизнеспособностью свободных клеток. Комплексы более чувствительны к замораживанию с высокими скоростями охлаждения. Объяснить полученные результаты можно особенностями процессов кристаллизации в клетках, контактирующих с порами и поверхностью носителя. Вероятность внутриклеточной кристаллизации повышается при заданной скорости охлаждения по мере уменьшения поверхностно-объемного отношения клетки и коэффициента проницаемости клеточной мембраны для молекул воды [9, 40]. В процессе замораживания комплексов «носитель-клетки»

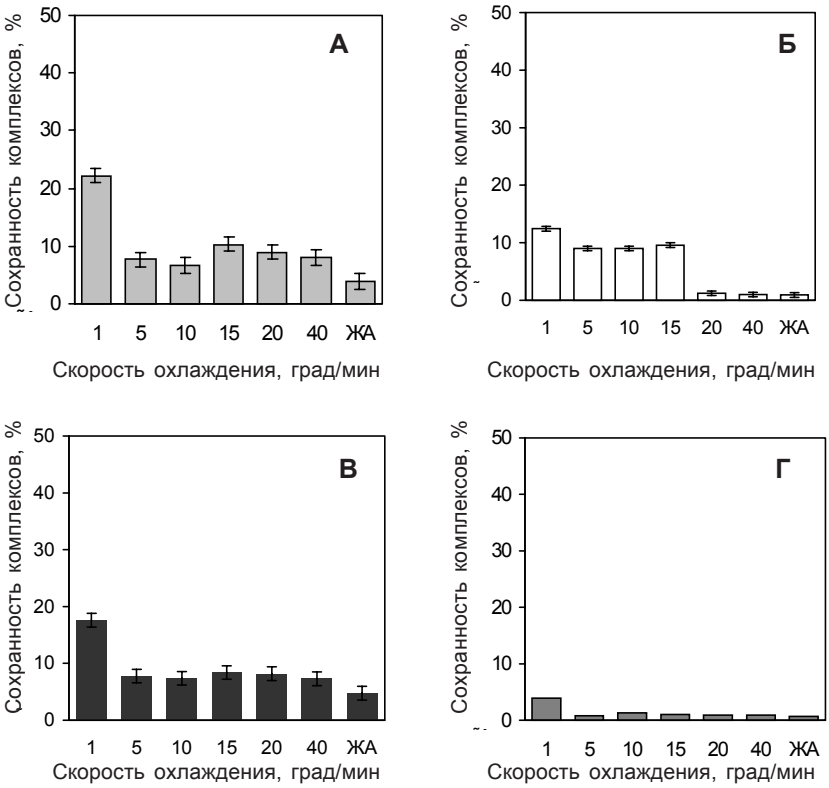


Рис. 2. Количество колониеобразующих комплексов «носитель («СУМС-1») – клетки дрожжей *S. boulardii*» после замораживания с разными скоростями охлаждения: : А – в физиологическом растворе; Б – пивном сусле; В – 5%-м водном растворе ДМСО; Г – 5%-м водном растворе сахарозы; ЖА – погружение в жидкий азот.

образование контактов между поверхностями сорбентов и иммобилизованными клетками эквивалентно уменьшению поверхности клеток. Поэтому процессы обезвоживания клеток становятся менее интенсивными, а оптимальная скорость охлаждения находится в области низких значений (порядка 1 град/мин).

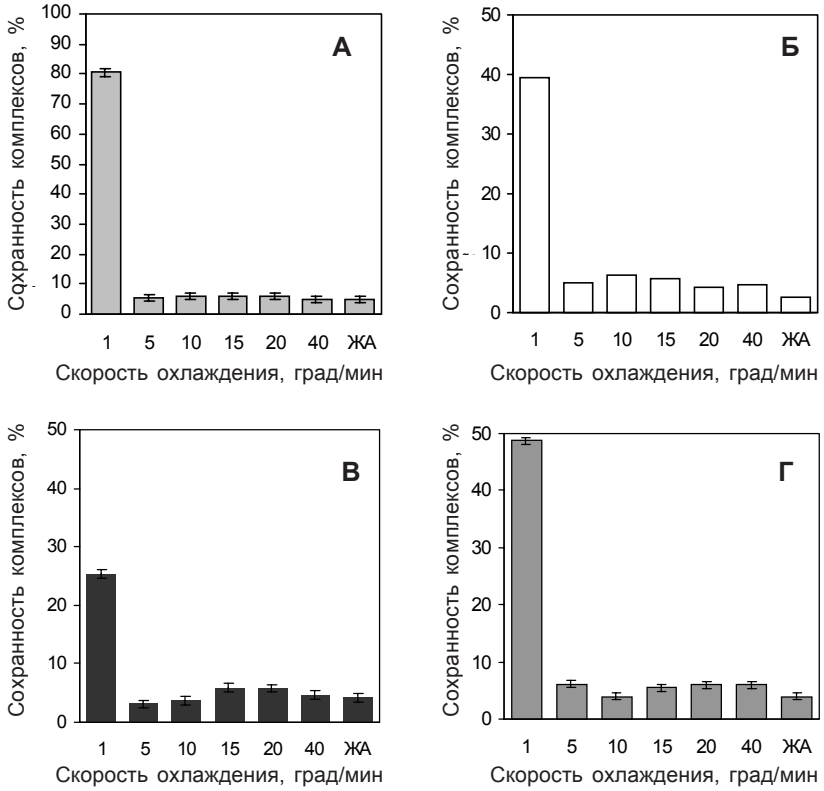


Рис. 3. Количество колониеобразующих комплексов «носитель («Сорбекс») – клетки дрожжей *S. boulardii*» после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – в физиологическом растворе; Б – пивном сусле; В – 5%-м водном растворе ДМСО; Г – 5%-м водном растворе сахарозы; ЖА – погружение в жидкий азот.

В процессе разработки протоколов криоконсервирования и технологий изготовления препаратов пробиотиков важно обеспечить сохранение исходных свойств (способность к колонизации эпителия кишечника, антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, чувствительность к антибиотикам, желудочному соку, желчи, ферментам

тонкой кишки), а также иммуномодулирующих характеристик. Нами были изучены перечисленные свойства пробиотика *S. boulardii*, иммобилизованного на углеродсодержащих энтеросорбентах «Сорбекс» и «СУМС-1» до и после криоконсервирования.

Установлено, что криоконсервирование и иммобилизация *S. boulardii* на указанных сорбентах не изменяют их чувствительность к антифунгальным препаратам «Нистатину», «Флюконазолу», «Интраконазолу», «Клотримазолу», «Амфотерицину В».

При изучении чувствительности клеток *S. boulardii* к растворам соляной кислоты выявлено, что свободные клетки до и после криоконсервирования при значениях pH 1,5–2,0 не погибают. При pH 1,0 их погибало незначительное количество (рис. 4). Комплексы «носитель-клетки» частично погибали при всех значениях pH. Криоконсервирование не изменяло дополнительно их чувствительность к значениям pH 1,0–2,0.

Была изучена способность к образованию макроколоний свободными клетками и комплексами «носитель-клетки» в ростовой среде с различной концентрацией (1–5%) смеси желчных солей.

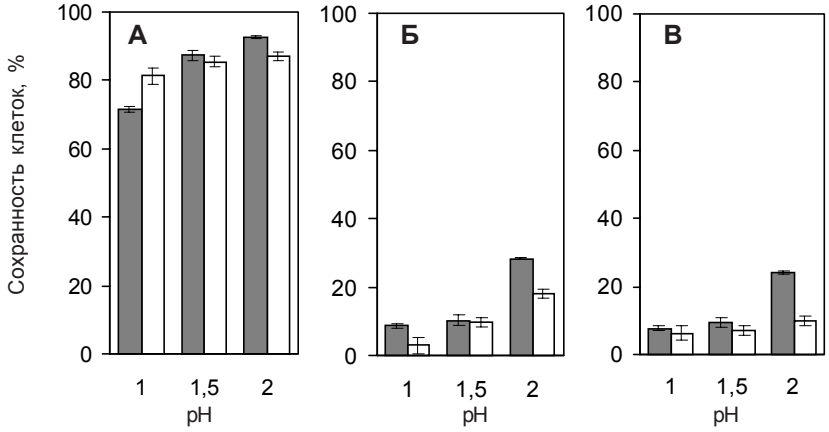


Рис. 4. Сохранность свободных и иммобилизованных клеток *S. boulardii*, инкубированных до (■) и после (□) криоконсервирования в растворах HCl с различным pH: А – свободные клетки; Б – иммобилизованные на «СУМС-1»; В – иммобилизованные на «Сорбексе».

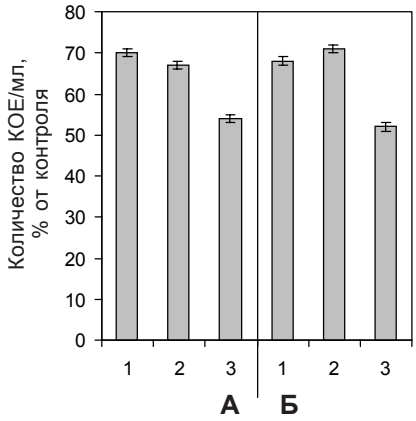


Рис. 5. Жизнеспособность свободных клеток *S. boulardii* и сохранность комплексов «носитель-клетки» после инкубирования в среде, содержащей 1% желчных солей: А – до криоконсервирования; Б – после криоконсервирования (1 – клетки *S. boulardii,* инкубированные на «Сорбексе»; 2 – клетки *S. boulardii,* инкубированные на «СУМС-1»; 3 – свободные клетки).

Следует отметить, что средняя концентрация желчных солей в кишечнике человека составляет 0,3 %. Свободные клетки и комплексы «носитель-клетки» полностью погибали при концентрации смеси желчных солей 2% и частично – при концентрации солей 1% (рис. 5). Устойчивость комплексов «носитель-клетки» к желчным солям в концентрации 1% была выше, чем у свободных клеток. Криоконсервирование не изменяло чувствительности комплексов и свободных клеток к желчным солям.

Иммобилизация на сорбентах и криоконсервирование не изменяли спектр сахаролитической активности клеток *S. boulardii*. Они ферментировали D-глюкозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, рафинозу и не ферментировали арабинозу, ксилозу, лактозу, трегалозу.

Установлено, что иммобилизация на энтеросорбентах «СУМС-1», «Сорбекс» и криоконсервирование не влияли на спектр антагонистической активности *S. boulardii* в отношении используемых в экспериментах микроорганизмов: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella choleraesuis*.

Как было указано выше, *S. boulardii* является транзиторным пробиотиком. Поэтому для определения его терапевтических свойств представляет интерес исследовать продолжительность

персистенции клеток *S. boulardii* в толстой кишке после однократного введения и в процессе терапии экспериментального дисбиоза различного генеза. В работе L. Edwards-Ingram с соавт. [38] показано, что клетки *S. boulardii* сохраняются в кишечнике мышей в течение 3 суток после однократного введения. В экспериментах с белыми лабораторными крысами нами установлено, что после однократного приема свободных клеток *S. boulardii* они персистируют в толстой кишке этих животных в течение 4–5 суток (рис. 6). После введения животным смеси свободных клеток и сорбентов «СУМС-1» и «Сорбекс» *S. boulardii* выделяли из фекалий в течение 5–6 суток. У животных, которым вводили нативные и криоконсервированные комплексы «носитель-клетки», срок персистенции *S. boulardii* в толстой кишке увеличивался до 10 суток. Достоверные различия между носителями отсутствовали.

Интегральной оценкой терапевтических свойств пробиотических препаратов является восстановление микробиоты после лечения дисбиоза. Было проведено две серии экспериментов. В первой серии изучали терапевтическое действие иммобилизованных на сорбентах «СУМС-1» и «Сорбекс» клеток *S. boulardii* при экспе-

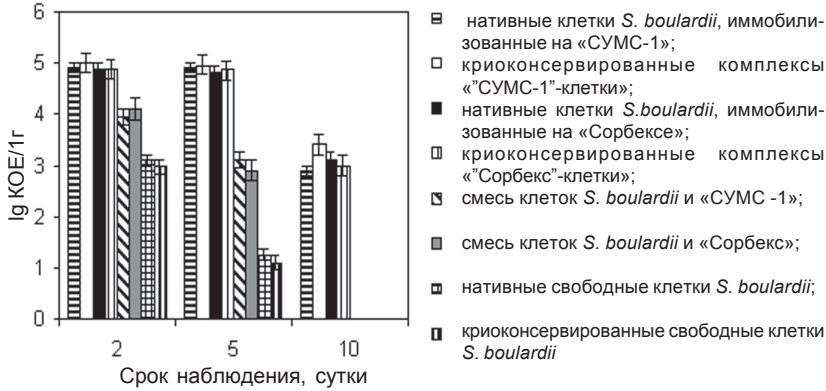


Рис. 6. Содержание *S. boulardii* в 1 г фекалий крыс после однократного введения комплексов «носитель-клетки» и смеси свободных клеток с сорбентами.

риментальном дисбиозе у иммуносупрессированных белых лабораторных мышей. Иммуносупрессию вызывали введением гидрокортизона ацетата, дисбиоз – ампициллина и метронидазола [3, 4]. Эта модель дисбиоза сопровождалась транслокацией кишечной микрофлоры (бактерий *E. coli* и бактерий родов *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Clostridium*) в мезентериальные лимфоузлы, печень, селезенку. Животные были разделены на 10 групп. В каждой группе терапию дисбиоза проводили следующими препаратами:

1 – свободные клетки *S. boulardii*;

2 – криоконсервированные свободные клетки *S. boulardii*;

3 – клетки *S. boulardii*, иммобилизованные на «СУМС-1»;

4 – клетки *S. boulardii*, иммобилизованные на «СУМС-1» (криоконсервированные комплексы «носитель-клетки»);

5 – клетки *S. boulardii*, иммобилизованные на «Сорбексе»;

6 – клетки *S.boulardii*, иммобилизованные на «Сорбексе» (криоконсервированные комплексы «носитель-клетки»);

7 – смесь свободных клеток *S. boulardii* и энтеросорбента «СУМС-1»;

8 – смесь свободных клеток *S. boulardii* и энтеросорбента «Сорбекс»;

9 – энтеросорбент «СУМС-1»;

10 – энтеросорбент «Сорбекс».

Установлено, что наиболее быстрое восстановление микрофлоры толстой кишки было в группах животных, получавших нативные и криоконсервированные препараты клеток *S. boulardii*, иммобилизованных на энтеросорбентах «СУМС-1» и «Сорбекс» (рис. 7, 8). В остальных группах сроки восстановления микрофлоры толстой кишки были более продолжительными и представляли следующий ряд: группы 7, 8 – группы 1, 2 – группы 9, 10.

После введения препаратов нативных и криоконсервированных иммобилизованных клеток *S. boulardii* они более длительный срок персистировали в кишечнике животных.

Микрофлору, которая транслоцировалась во внутренние органы мышей после иммуносупрессии, высевали в контрольной группе и опытных группах 9, 10 из печени в течение 2 суток, селезенки – 5 суток, мезентериальных лимфоузлов – 14 суток (рис. 9). В опытных группах 1, 2 микрофлору высевали из печени в течение 2 суток,

селезенки – 5 суток, мезентериальных лимфоузлов – 10 суток. В опытных группах 3–6 микрофлору высевали из печени и селезенки в течение 2 суток, мезентериальных лимфоузлов – 10 суток. Достоверные различия в сроках эрадикации микроорганизмов из внутренних органов после терапии экспериментального дисбиоза нативными и криоконсервированными препаратами отсутствовали.

Во второй серии экспериментов изучали терапевтическое действие иммобилизованных клеток *S. boulardii* при экспериментальном химиотерапевтическом дисбиозе у белых лабораторных крыс. Дисбиоз также вызывали введением ампициллина и метрони-

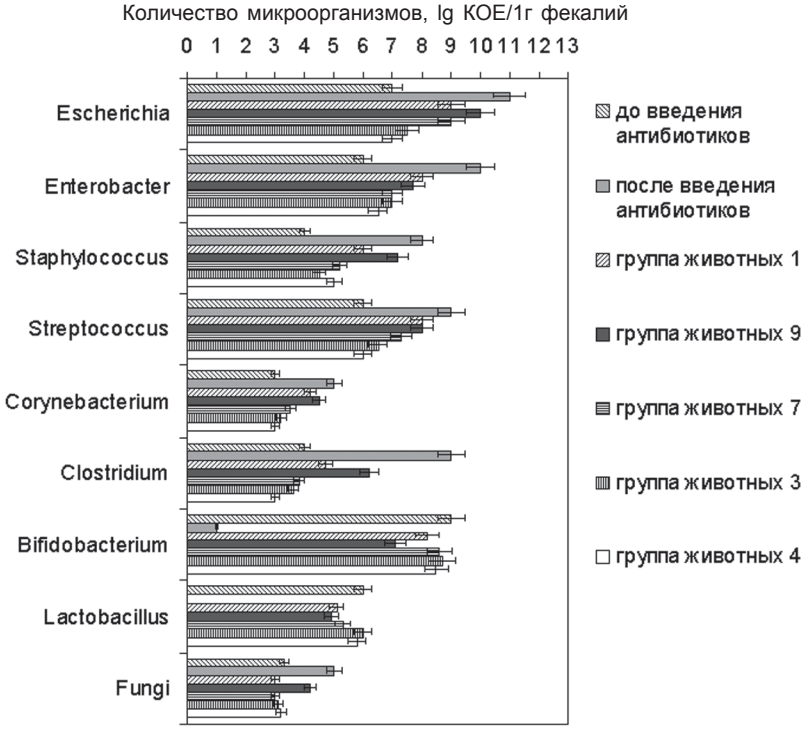


Рис. 7. Динамика восстановления микробиоценоза кишечника иммуносупрессированных мышей после применения *S. boulardii*, иммобилизованных на «СУМС-1».

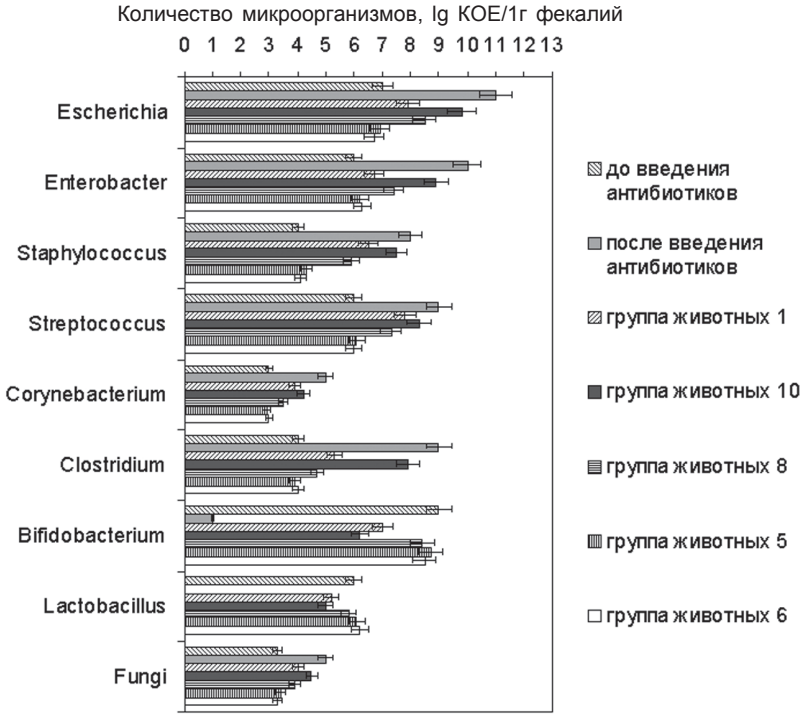


Рис. 8. Динамика восстановления микробиоценоза кишечника иммуносупрессированных мышей после применения *S. boulardii*, иммобилизованных на «Сорбексе».

дазола. В опытных группах животных изучали восстановление кишечной микрофлоры после терапии нативными и криоконсервированными свободными клетками *S. boulardii* и комплексами «носитель-клетки», энтеросорбентами «Сорбекс», «СУМС-1», смесями энтеросорбентов и дрожжевых клеток. Установлено, что микрофлора толстой кишки крыс с экспериментальным дисбиозом также наиболее быстро и в полном объеме восстанавливалась после приема препаратов иммобилизованных пробиотиков (рис. 10, 11). Различия в терапевтическом действии нативных и криоконсервированных комплексов «носитель-клетки» отсутствуют. Клетки

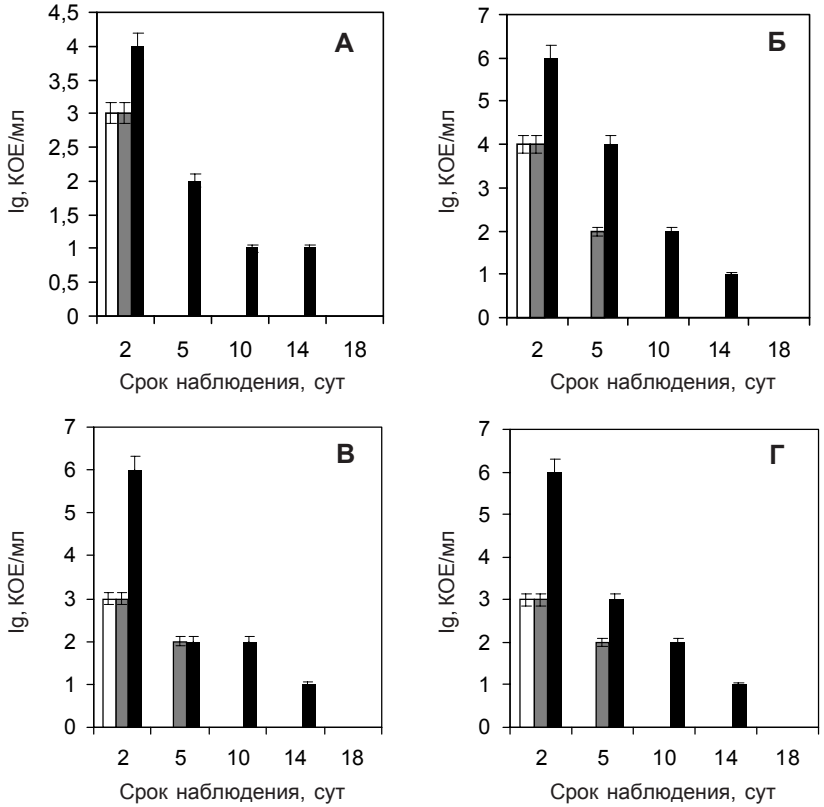


Рис. 9. Высеваемость микроорганизмов из внутренних органов иммуносупрессированных мышей с химиотерапевтическим дисбиозом кишечника: А – контрольная группа; Б – введение энтеросорбентов (группы 9, 10); В – введение нативных и криоконсервированных свободных клеток (группы 1,2); Г – введение нативных и криоконсервированных комплексов «носитель-клетки» (группы 3–6); □ – селезёнка; ▒ – печень; ■ – мезентериальные лимфоузлы.

S. boulardii выделяли из фекалий животных, принимавших препараты иммобилизованного пробиотика, в течение 7–10 суток после окончания курса терапии, а из фекалий животных, принимавших различные комбинации свободных клеток, – 2–5 суток [5].

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о перспективности применения препаратов пробиотиков, иммобилизованных на сорбентах, особенно в тех случаях, когда необходимо улучшить колонизацию кишечника пробиотиками и пролонгировать персистенцию транзиторных пробиотиков. Важную роль в создании и применении таких препаратов играет их хранение при низких температурах, в том числе криоконсервирование. Сохранность комплексов микробных клеток, иммобилизованных на сорбентах, после криоконсервирования ниже жизнеспособности свободных клеток, криоконсервированных в суспензиях.

В отличие от разработок препаратов микроорганизмов, иммобилизованных на носителях, исследования по созданию препаратов микроорганизмов, иммобилизованных в гелевых носителях, полу-

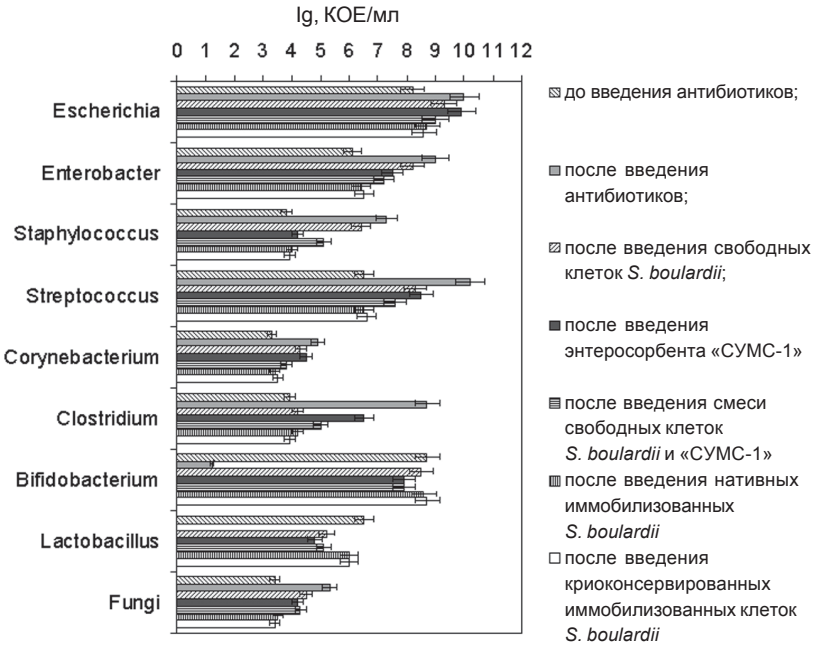


Рис. 10. Динамика восстановления микробиоценоза кишечника крыс с экспериментальным дисбиозом после приема пробиотика *S.boulardii*, иммобилизованного на «СУМС-1».

чили большее распространение. На основе результатов этих исследований разработаны технологии производства пищевых продуктов. Было изучено влияние на жизнеспособность и биологические свойства молочнокислых бактерий таких факторов, как состав гелевых матриц, температура хранения, состав окружающей гелевые матрицы среды.

Показано, что иммобилизация в гелях существенно не влияет на основные биологические и потребительские свойства молочнокислых микроорганизмов. А гелевая матрица и особенно оболочка вокруг гелевых гранул (из альгината кальция, хитозана, желатина и др.) обеспечивают более высокую устойчивость микробных препаратов к желудочному соку, желчи и ферментам поджелудочной железы и тонкого кишечника [49, 51, 64].

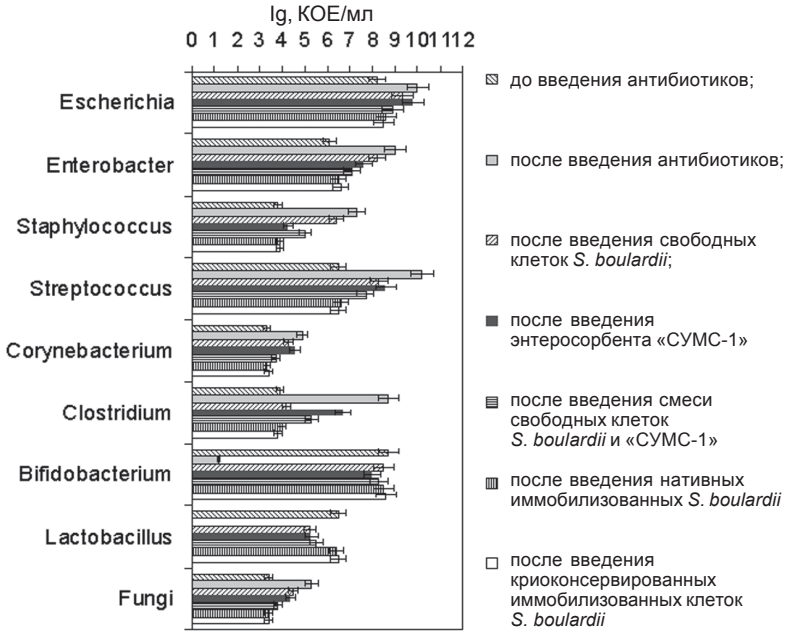


Рис. 11. Динамика восстановления микробиоценоза кишечника крыс с экспериментальным дисбиозом после приема пробиотика *S.boulardii*, иммобилизованного на «Сорбексе».

В исследовании A.M. Urbanska и соавторов [64] бактерии *L.acidophilus* иммобилизовали в гранулах альгината натрия и хитозана. Гранулы помещали в йогурт и физиологический раствор и хранили при комнатной температуре. Через 4 недели количество жизнеспособных бактерий в образцах, хранившихся в йогурте, оставалось на исходном уровне, а в физиологическом растворе – достоверно снижалось.

Иммобилизованные в гранулы альгината натрия с покрытием из альгината кальция или хитозана бактерии *L. bulgaricus* сохраняли исходную жизнеспособность после хранения при 4°С в течение 4 недель [50]. При 22°С количество жизнеспособных бактерий в гранулах альгината с покрытием из хитозана также не изменялось в течение 4 недель, а с покрытием из альгината кальция – незначительно уменьшалось. В то же время в образцах со свободными клетками, суспендированными в жидких средах, отмечена значительная гибель этих бактерий.

В исследовании J.H. Tsen и соавторов [62] бактерии *Lactobacillus reuteri* иммобилизовали в микрочастицах альгината, покрытых оболочками из альгината кальция, и в частицах из каррагинана. Контролем была суспензия свободных клеток. Образцы замораживали в морозильных камерах с температурой –20, –40, –60, –80°С. Через 24 ч при всех температурных режимах камер более высокое количество жизнесопособных бактерий было в образцах с иммобилизованными клетками. Часть образцов хранили в течение 12 месяцев при –40 и –80°С. Более высокие показатели жизнесопособности во всех образцах обеспечивало хранение при –80°С. Максимальное количество жизнеспособных клеток после хранения при –40 и –80°С было в образцах с бактериями, иммобилизованными в альгинатном геле.

В результате исследованиий T.Y. Sheu и соавторов [60] разработана рецептура десерта из мороженого, содержащего иммобилизованные или свободные клетки *L. bulgaricus*. Бактерии были иммобилизованы в микрочастицах альгинатного геля, покрытых пленкой из альгината кальция. В некоторые образцы в альгинат добавляли глицерин, маннитол, глюкозу. В качестве контроля служила суспензия *L. bulgaricus* в дистиллированной воде. Все образцы хранили при –18°С в течение 14 суток. Максимальная

сохранность бактерий была отмечена в образцах бактерий, иммобилизованных в геле с добавлением глицерина или маннитола, более низкие показатели жизнеспособности – в образцах с бактериями, иммобилизованными в альгинатном геле и геле с добавлением глюкозы. В образцах со свободными клетками показатели жизнеспособности были достоверно ниже.

В.Л. Пономаревой и соавторами [24] было изучено влияние условий криоконсервирования на жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных в гранулах геля альгината натрия, покрытых пленкой из альгината кальция. Замораживали четыре группы образцов:

– суспензия клеток в дистиллированной воде;

– клетки, иммобилизованные в 1%-м альгинатном геле;

– суспензия клеток в 5%-м водном растворе ДМСО;

– иммобилизованные клетки, которые предварительно выдерживали 5–7 мин в 5%-м растворе ДМСО.

Образцы охлаждали со скоростями 1, 5, 10, 15 град/мин до –40°С с последующим погружением в жидкий азот. Часть образцов замораживали погружением в жидкий азот.

Установлено, что на жизнеспособность свободных клеток в суспензиях значимое влияние оказывали и скорость охлаждения, и наличие криопротектора в среде консервирования. Наиболее высокие показатели жизнеспособности клеток наблюдали после замораживания со скоростями 1–5 град/мин (рис. 12, А). С повышением скорости охлаждения количество жизнеспособных клеток понижалось и достигало минимума после замораживания погружением в жидкий азот. ДМСО оказывал криозащитное действие при охлаждении со скоростями 1–15 град/мин (рис. 12, Б). При охлаждении со скоростью 1 град/мин количество жизнеспособных клеток в суспензии, содержащей 5% ДМСО, было максимальным.

После замораживания дрожжей, иммобилизованных в гранулах альгинатного геля, количество жизнеспособных клеток было достоверно выше, чем в суспензиях свободных клеток (рис. 13). Предшествующее иммобилизации инкубирование дрожжей в 5%-м растворе ДМСО не оказывало достоверного влияния на их жизнеспособность при замораживании по сравнению с замораживанием клеток из второй группы образцов.

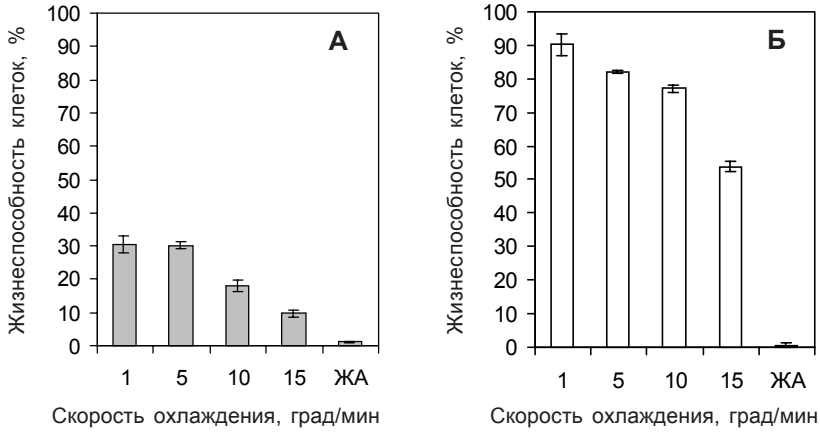


Рис. 12. Жизнеспособность свободных клеток *S.cerevisiae* после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – суспензия клеток в дистиллированной воде; Б – суспензия клеток в 5%-м растворе ДМСО; ЖА – погружение в жидкий азот.

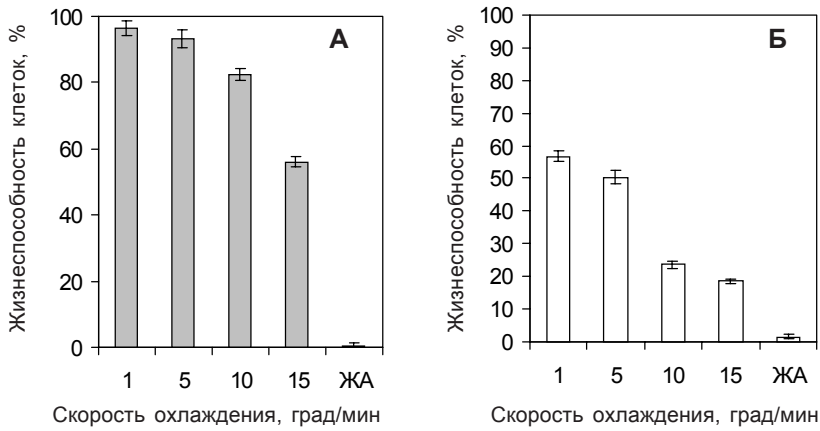


Рис.13. Жизнеспособность, иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* после замораживания с разными скоростями охлаждения: А – клетки, иммобилизованные в 1%-м геле альгината натрия; Б – клетки, иммобилизованные в геле после инкубирования в 5% растворе ДМСО; ЖА – погружение в жидкий азот.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что альгинатный гель при замораживании проявляет свойства экстрацеллюлярного криопротектора.

Принимая во внимание установленное криозащитное действие альгината в гранулах с иммобилизованными микробными клетками *S. cerevisiae*, изучили защитные свойства альгината при стандартном криоконсервировании клеточных суспензий бактерий *B. bifidum* и *L. bulgaricus*. Исходная концентрация клеток составляла 10^{10} КОЕ/мл.

При криоконсервировании бактерий использовали следующие среды:

1) ростовая среда Блаурокка [21];

2) 1%-й раствор альгината натрия;

3) среда СМЛ/50 [33];

4) среда СМЛ/100 (водный раствор 4%-й сахарозы с добавлением 10% обезжиренного молока, 2% лактозы);

5) 0,5%-й раствор альгината натрия;

6) дистиллированная вода (при замораживании *L. bulgaricus*).

Бактерии замораживали со скоростями 1, 5, 10, 15 град/мин до – 40°С с последующим погружением криопробирок в жидкий азот. Часть образцов замораживали погружением в жидкий азот.

Установлено, что жизнеспособность *B. bifidum* и *L. bulgaricus* в условиях проведенных экспериментов значительно изменяется в разных средах и при разных режимах охлаждения (рис. 14). Так, после замораживания со скоростью 1 град/мин количество жизнеспособных клеток *B. bifidum* снижалось в среде 1 до 52%, а в остальных средах – достоверно не отличалось от исходных значений. После замораживания со скоростью 5 град/мин достоверное снижение количества жизнеспособных клеток было в образцах со средами 4, 5. После замораживания со скоростью 10 град/мин исходное количество жизнеспособных клеток оставалось в среде 2, а со скоростью 15 град/мин – в средах 1–3. При замораживании погружением криопробирок в жидкий азот во всех средах, за исключением среды 3, сохранялось исходное количество жизнеспособных бактерий.

В экспериментах с *L. bulgaricus* после замораживания со скоростью 1 град/мин количество жизнеспособных клеток сохраня-

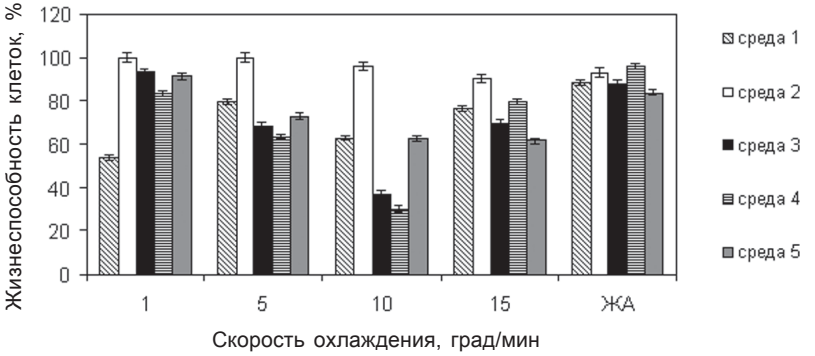


Рис. 14. Жизнеспособность бактерий *B. bifidum* 1 после замораживания-отогрева в различных защитных средах; ЖА – погружение в жидкий азот.

лось на исходном уровне в среде 1, со скоростью 5 град/мин – в средах 2–4; 10 град/мин – в средах 1–4; 15 град/мин – в средах 2, 4, при замораживании погружением в жидкий азот – в средах 1, 3 (рис. 15). Максимальный криозащитный эффект альгината натрия для бактерий этого вида проявлялся при охлаждении со скоростями 5–15 град/мин и при увеличении его концентрации с 0,5 до 1%.

Таким образом, результаты приведенных публикаций и данные наших исследований свидетельствуют о перспективности использования гелевых носителей для хранения микроорганизмов. Показана возможность хранения при комнатной и разных умеренно низких температурах пищевых продуктов, содержащих иммобилизованные в гелевых гранулах микроорганизмы – пробиотики. На жизнеспособность этих микроорганизмов оказывают влияние наличие покрытия на поверхности гелевых гранул, состав среды, в которую помещены гелевые гранулы, добавление в гель глицерина или маннитола.

Нами было показано, что при криоконсервировании бактерий *L. bulgaricus* и *B. bifidum* по стандартным протоколам выраженные криозащитные свойства оказывает 0,5–1%-й гель альгината натрия без формирования гелевых гранул. На жизнеспособность

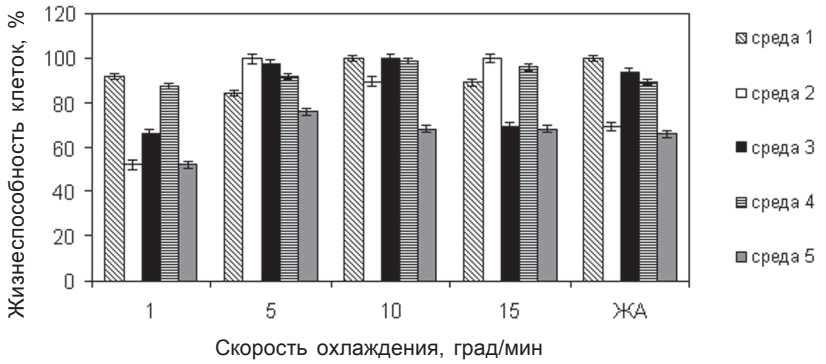


Рис. 15. Жизнеспособность бактерий *L. bulgaricus* 1Z 03501 после замораживания-отогрева в различных защитных средах; ЖА – погружение в жидкий азот.

бактерий, криоконсервированных в геле альгината натрия, также как и после криоконсервирования в других защитных средах, влияет скорость охлаждения. В опытах по криоконсервированию клеток дрожжей *S. cerevisiae*, иммобилизованных в гранулах 1%-го геля альгината натрия с покрытием из альгината кальция, альгинатный гель также оказывал криозащитное действие, а жизнеспособность иммобилизованных клеток зависела от скорости охлаждения.

Криоконсервирование аспорогенных анаэробных бактерий

В настоящее время приобрела актуальность проблема гнойно-воспалительных заболеваний, этиологическими факторами которых являются аспорогенные анаэробные бактерии. Большинство анаэробных инфекций имеет эндогенный характер вследствие снижения иммунной реактивности организма различного генеза и возрастания множественной антибиотикорезистентности клинически значимых видов аспорогенных анаэробных бактерий [21]. В связи с этим необходимо создание коллекций штаммов аспорогенных анаэробных бактерий, выделенных от больных. Используя данные штаммы, проводят эпидемиологический анализ, изучают

факторы патогенности, вирулентности и механизмы антибиотикорезистентности циркулирующих штаммов, исследуют особенности патогенеза и разрабатывают рациональные схемы этиотропной терапии.

В большинстве случаев аспорогенные анаэробные бактерии хранят в лиофилизированном виде и условиях гипотермии под минеральным маслом с периодическими пересевами. Сроки хранения ряда штаммов при использовании этих методов ограничены, поскольку анаэробные бактерии не вырабатывают ферменты, расщепляющие токсические соединения кислорода (каталазу, супероксид-дисмутазу) [21, 53], а продукты перекисного окисления могут быть повреждающим фактором при лиофилизации, замораживании и хранении клеток при умеренно низких температурах [17, 55].

В ИПКиК НАН Украины были проведены эксперименты по разработке эффективного метода криоконсервирования типовых аспорогенных анаэробных бактерий *B. fragilis*, *P. melaninogenica*, *F. necroforum*, *M. curtisii*, *P. niger*, *P. anaerobius*, *V. parvula*. Бактерии выращивали на анаэробном гемагаре в анаэростате в трехкомпонентной газовой смеси (80% азота, 10% водорода, 10% углекислого газа). Жизнеспособность бактерий определяли «чашечным» методом Коха по количеству сформировавшихся на поверхности гемагара колоний. Биологические свойства бактерий изучали с использованием стандартных методик [14].

При изучении криорезистентности аспорогенные анаэробные бактерии замораживали с разными скоростями в дистиллированной воде, физиологическом растворе, мясопептонном бульоне (МПБ). Замораживание осуществляли по четырем режимам:

1 – охлаждение до –40°С со скоростью 1 град/мин, погружение в жидкий азот;

2 – охлаждение до –40°С со скоростью 10 град/мин, погружение в жидкий азот;

3 – охлаждение до –40°С со скоростью 20 град/мин, погружение в жидкий азот;

4 – погружение криопробирок в жидкий азот.

Установлено, что аспорогенные анаэробные бактерии криолабильны. Количество жизнеспособных клеток после замораживи-

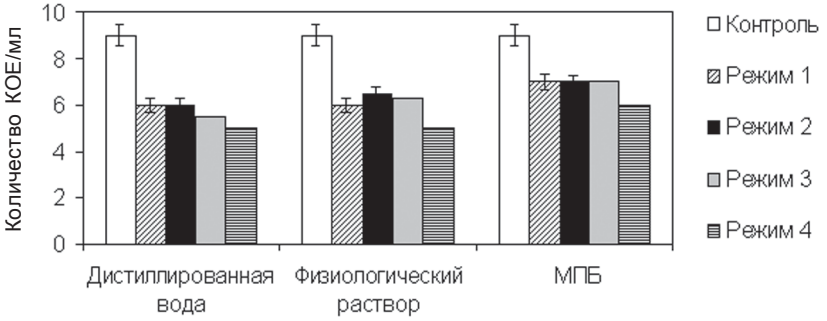


Рис. 16. Жизнеспособность бактерий *P. anaerobius*, суспендированных в различных средах, после замораживания-отогрева по разным режимам. Контроль – исходная суспензия.

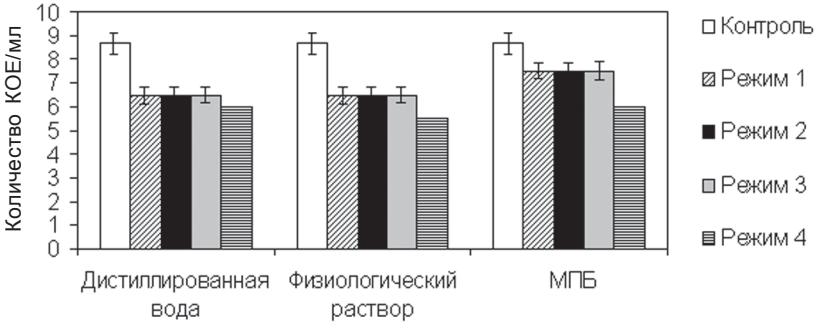


Рис. 17. Жизнеспособность бактерий *P. anaerobius*, суспендированных в различных средах с добавлением 10% ДМСО, после замораживания-отогрева по разным режимам. Контроль – исходная суспензия.

вания по разным режимам снижалось в 10^3–10^5 раз. Наиболее высокой криоустойчивостью обладали бактерии *P. anaerobius*, наиболее низкой – *M. curtisii*. На показатели жизнеспособности влияли состав среды консервирования и режим охлаждения. Более высокую жизнеспособность обеспечивало охлаждение со скоростями 1–20 град/мин и среда консервирования МПБ с 5% ДМСО. На рис. 16, 17 представлены результаты экспериментов с *P. anaerobius*. Аналогичные зависимости выживаемости бактерий от

условий криоконсервирования были получены в опытах с другими видами бактерий.

Учитывая криолабильность аспорогенных анаэробных бактерий, сложность в создании условий анаэробиоза при переводе бактерий в консервирующие среды, было необходимо разработать среду консервирования, обеспечивающую высокую сохранность всех видов аспорогенных анаэробных бактерий. После экспериментов с разными составами была выбрана следующая среда: ростовая среда Н3ТА (полужидкий обогащенный тиогликолевый агар с Твин-80, менадионом и гемином) с добавлением 5–10% ДМСО и 2% тиомочевины в качестве антиоксиданта [7, 14]. После замораживания в этой среде количество жизнеспособных бактерий повышалось в 10^2–10^4 раз и снижалось влияние режимов охлаждения.

Для оценки эффективности среды консервирования изучали сохранность дифференциальных признаков, используемых для идентификации аспорогенных анаэробных бактерий после криоконсервирования. Установлено, что долгосрочное хранение при температуре –196°С не изменяет культуральные свойства, спектры биохимических и ферментативных свойств, а также чувствительность к антибиотикам аспорогенных анаэробных бактерий.

Экспериментально обоснованный состав среды криоконсервирования аспорогенных анаэробных бактерий был рекомендован для использования в практике низкотемпературных банков микроорганизмов.

Криоконсервирование дрожжеподобных грибов рода *Candida*

В последние десятилетия во всем мире наблюдается рост заболеваний, вызванных грибами. По данным Всемирной организации здравоохранения этими заболеваниями страдает десятая часть населения Земли. Самым распространенным возбудителем микозов являются грибы рода *Candida*. Существующие средства специфической профилактики кандидозов недостаточно эффективны, а выбор антимикотических препаратов ограничен. Часто встре-

чаются штаммы дрожжеподобных грибов рода *Candida*, резистентные к большинству антимикотических препаратов.

В связи с вышесказанным важно создание коллекций штаммов грибов рода *Candida*, которые необходимы для эпидемиологического мониторинга участия различных видов грибов рода *Candida* в патогенезе заболеваний, разработки новых антифунгальных препаратов и препаратов для специфической профилактики.

Мы провели исследования по разработке эффективной технологии криоконсервирования дрожжеподобных грибов вида *Candida albicans*.

Вначале была проведена теоретическая оценка оптимальной скорости охлаждения клеток *C. albicans* с учетом их геометрических характеристик и транспортных функций клеточных мембран, а затем экспериментальное изучение жизнеспособности клеток после замораживания с различными скоростями.

Экспериментально определены линейные размеры, объем и площадь поверхности клеток *C. albicans*, а также проведены расчеты зависимости доли клеток, поврежденных в результате внутриклеточной кристаллизации, от скорости охлаждения клеточной суспензии в 5%-м водном растворе ДМСО. Рассчитано, что эффективная скорость охлаждения в данном растворе для клеток *C. albicans* приблизительно равна 7 град/мин [2].

Для проверки корректности теоретических расчетов были проведены эксперименты по изучению влияния скоростей охлаждения, определенных при построении математической модели, на жизнеспособность дрожжеподобных клеток, замороженных в 5%-м водном растворе ДМСО. Полученные экспериментальные данные подтвердили расчетную зависимость жизнеспособности клеток от повреждающего действия внутриклеточной кристаллизации, интенсивность которой обусловлена скоростью охлаждения. Максимальную жизнеспособность клеток наблюдали после замораживания со скоростью охлаждения 7 град/мин. Она составляла 35% в водных растворах ДМСО и 21% в дистиллированной воде (рис. 18).

С учетом теоретически рассчитанной эффективной скорости охлаждения для клеток *C. albicans* и данных, полученных в экс-

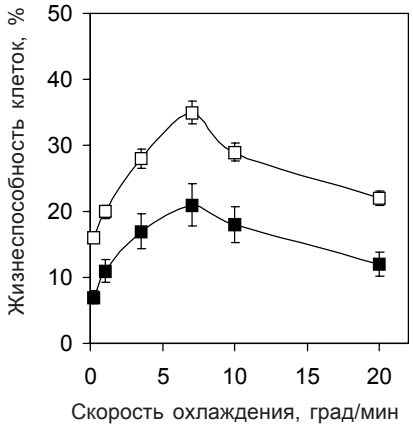


Рис. 18. Влияние скорости охлаждения при замораживании на жизнеспособность клеток *C. albicans*, суспендированных в дистиллированной воде (■) и 5%-м водном растворе ДМСО (□).

периментах по замораживанию этих клеток в 5%-м растворе ДМСО, было изучено влияние на их жизнеспособность различных скоростей охлаждения и состава среды консервирования. В качестве консервирующих сред использовали пивное сусло 8°Б и пивное сусло 8°Б с добавлением одного из криопротекторов (ДМСО, глицерина, этанола) в конечной концентрации 5 или 10%. Установлено, что на жизнеспособность клеток *C. albicans* в процессе криоконсервирования (как и на сохранность большинства других микроорганизмов) влияют и скорость охлаждения, и состав консервирующей среды. Максимальную жизнеспособность обеспечивало охлаждение со скоростями от 3,5 до 7 град/мин в пивном сусле с добавлением 5% ДМСО или глицерина. При более низких или высоких скоростях охлаждения количество жизнеспособных клеток снижалось (рис. 19). Наиболее низкие показатели жизнеспособности клеток были в образцах, замороженных погружением в жидкий азот.

При замораживании клеток *C. albicans* в растворах криопротекторов на пивном сусле интервал скоростей охлаждения, обеспечивающих максимальную жизнеспособность клеток, увеличился с 3,5 до 7 град/мин по сравнению с теоретическими данными, рассчитанными для водных растворов (рис. 19). Согласно представлениям о механизмах повреждения клеток при замораживании гибель клеток при скоростях охлаждения ниже 7 град/мин связана с воздействием таких физико-химических факторов, как гиперконцентрация электролитов, изменение pH внеклеточной среды,

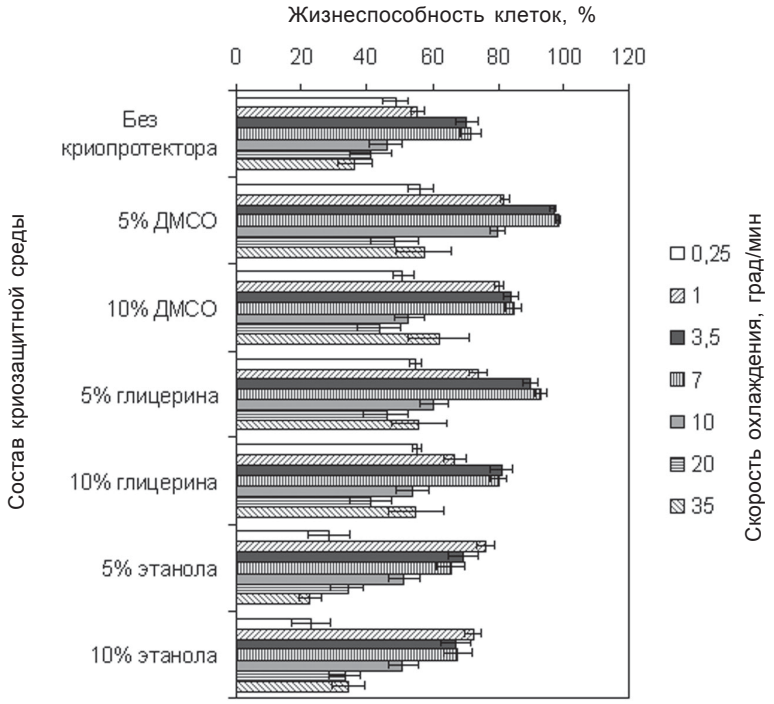


Рис. 19. Влияние состава криозащитных сред и скоростей охлаждения на жизнеспособность клеток *C. albicans*. За 100% принята жизнеспособность (КОЕ/мл) до замораживания-отогрева.

осмотические градиенты, фазовые переходы в цитоплазматических мембранах при низких температурах. Поскольку растворы криопротекторов на пивном сусле представляют собой многокомпонентные защитные среды с различными механизмами защитного действия, они, предположительно, уменьшают повреждающее влияние физикохимических факторов, реализуемых в интервалах скоростей охлаждения от 3,5 до 7 град/мин.

Значительный интерес в изучении общих проблем обратимого перевода биологических объектов в состояние холодового анабиоза

представляет исследование влияния условий криоконсервирования на развитие нелетальных и условно-летальных повреждений в клетках, сохранивших способность к пролиферации. Интересные результаты по данной проблеме были получены в экспериментах с клетками *C. albicans*.

Зависимость жизнеспособности клеток *C. albicans* от режимов охлаждения и среды консервирования хорошо соотносится с показателями содержания реактивных форм кислорода. В минимальных количествах они образуются как продукты нормального метаболизма клетки и участвуют в обеспечении адаптивной реакции клеток на внешние раздражители, в частности мобилизации систем ионного транспорта. В микробных клетках антиоксидантную защиту от повышенных концентраций реактивных форм кислорода выполняют каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и т.п. Повышенная продукция реактивных форм кислорода в клетках после криоконсервирования может вызвать нарушения метаболизма, приводящие к их гибели путем апоптоза или некроза [39]. Для индикации наличия реактивных форм кислорода в клетках *C. albicans* был выбран флуоресцентный краситель 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат ($DCFH_2$-DA), который используют для обнаружения гидроперекисей липидов [37]. Содержание клеток, окрашенных $DCFH_2$-DA регистрировали с помощью методов проточной цитофлуориметрии и лазерной конфокальной микроскопии [58, 59]. Установлено, что содержание $DCFH_2$-DA^+ – клеток в образцах клеточных суспензий после криоконсервирования увеличивается и коррелирует с условиями криоконсервирования и количеством клеток, утратившим способность к пролиферации (рис. 20) [1].

О наличии нелетальных и условно-летальных повреждений в криоконсервированных клетках *C. albicans* свидетельствуют результаты изучения их пролиферативных свойств в периодических культурах. Клетки замораживали в пивном сусле и пивном сусле с добавлением 5%-го ДМСО. Образцы охлаждали со скоростью 7 град/мин до –40°С с последующим погружением в жидкий азот, после отогрева клетки высевали в пивное сусло. Объем инокулюма

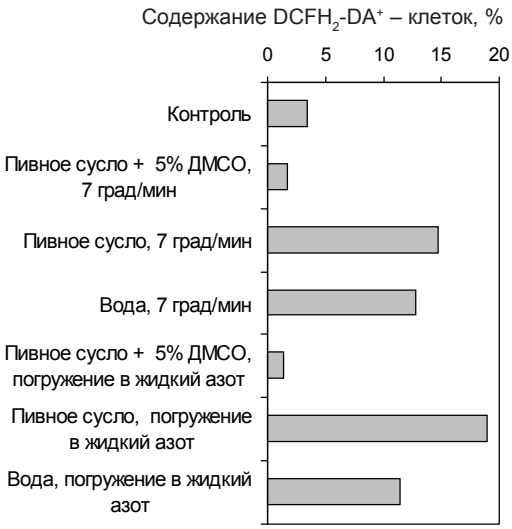


Рис. 20. Содержание клеток $DCFH_2$-DA^+ в суспензии *C. albicans* после замораживания-отогрева в различных средах, определенное с помощью проточной цитофлуориметрии и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

при посеве клеток, криоконсервированных без ДМСО, увеличивали на 15%, чтобы компенсировать число погибших клеток.

Установлено, что при посеве криоконсервированных клеток *C. albicans* log-фаза периодической культуры удлиняется на 1,5–2 ч (рис. 21). Отмечен также более медленный рост культур в первой трети log-фазы периодической культуры. На последующих этапах скорость деления клеток увеличивалась, и они выходили в стационарную фазу роста в те же временные ин-

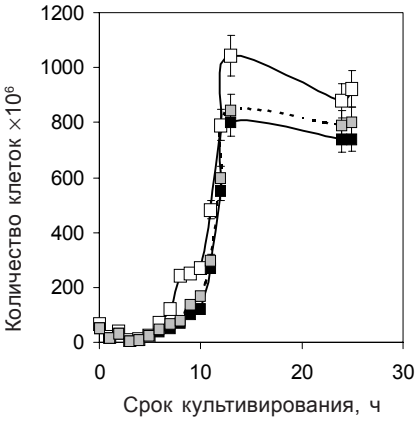


Рис. 21. Кривые роста периодических культур грибов *C.albicans* после замораживания-отогрева: □ – исходная культура; ▨ – замораживание-отогрев в пивном сусле; ■ – замораживание-отогрев в пивном сусле + 5% ДМСО

тервалы, что и контрольная культура. Достоверных различий в скорости роста периодических культур после посева клеток, криоконсервированных как в пивном сусле, так и в пивном сусле с добавлением 5% ДМСО, не установлено.

О выраженности условно-летальных повреждений после замораживания с разными скоростями охлаждения и отогрева свидетельствуют и результаты изучения пролиферативных свойств криоконсервированных клеток после модификации их цитоплазматических мембран нистатином сразу после отогрева. Были подобраны условия инкубации с нистатином, при которых все клетки сохраняли способность к пролиферации, но часть стиролов цитоплазматической мембраны этих клеток связывалась с молекулами нистатина, и мембрана частично утрачивала транспортные функции [2]. Криопробирки с суспензией клеток охлаждали со скоростью 7 град/мин до –40°С с последующим погружением в жидкий азот, прямым погружением в жидкий азот и размещением в морозильной камере холодильника при –16°С. После замораживания образцы отогревали и часть клеток инкубировали в течение 60 мин с нистатином. Затем все клетки отмывали и высевали «чашечным» методом Коха. Установлено, что во всех образцах, подвергавшихся после отогрева дополнительной инкубации с нистатином, количество колониеобразующих клеток снижалось. Наиболее вероятно это связано с тем, что у части клеток, дополнительно утративших способность к пролиферации, блокирование транспортных функций ЦПМ нистатином привело к нарушению репарации условно-летальных повреждений (рис. 22)

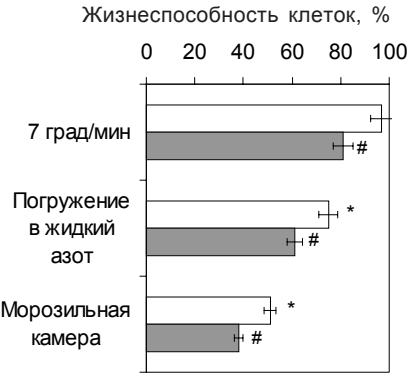


Рис. 22. Жизнеспособность криоконсервированных клеток *C. albicans*, подвергавшихся после отогрева инкубированию с нистатином: □ – замораживание-отогрев; ▩ – замораживание-отогрев + нистатин.

Как было отмечено в начале главы, методы консервирования микроорганизмов должны обеспечивать сохранность их генетически детерминированных свойств, в частности, используемых для идентификации. Были изучены биологические свойства использованного в исследованиях штамма *C. albicans* до и после хранения при температуре жидкого азота в течение 4 лет (срок наблюдения).

Установлено, что замораживание в дистиллированной воде, пивном сусле и пивном сусле с добавлением 5% ДМСО со скоростью 7 град/мин и погружением в жидкий азот как после кратковременного, так и последующего хранения в течение 4 лет, не изменяли способности клеток *C. albicans* ферментировать глюкозу, мальтозу, галактозу, сахарозу, лактозу.

После криоконсервирования сохранялся спектр чувствительности *C. albicans* к антимикотическим препаратам с разными мишенями воздействия – нистатину, кетоконазолу, флуконазолу, клотримазолу, амфотерицину В.

Впервые была изучена сохранность после криоконсервирования одного из факторов патогенности *C. albicans* – адгезивной активности. Исследовали адгезию клеток *C. albicans* к фибробластам кожи человека [27].

Коэффициент корреляции показателей адгезии с жизнеспособностью (0,949 при уровне значимости 0,01) показал, что после криоконсервирования по разным режимам структура клеток *C. albicans*, ответственная за адгезивный потенциал, не повреждается (рис. 23).

Замораживание до –196°С с разными скоростями охлаждения и последующее хранение при этой температуре в течение четырех лет не вызывало индукции cdc-мутаций и не изменяло способности специфических участков ДНК длиной 500 п. н. (по крайней мере у части клеток) к амплификации в полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности метода криоконсервирования при долгосрочном хранении грибов рода *Candida*. Разработанный протокол криоконсервирования обеспечивает максимальное количество жизнеспособных клеток и одновременно минимальное количество нелетальных и условно-

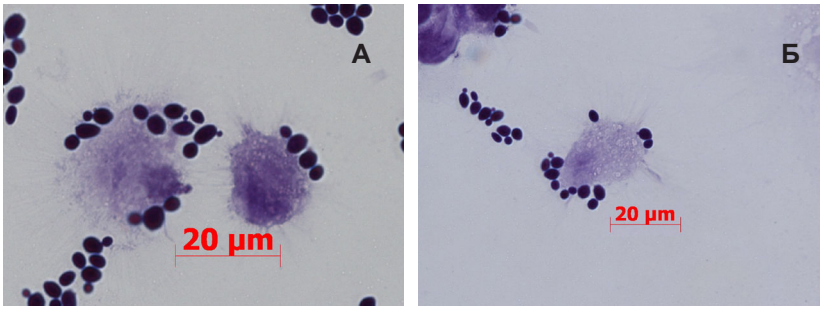


Рис. 23. Адгезия клеток *C. albicans* к фибробластам кожи человека: А – до криоконсервирования; Б – после замораживания-отгорева в сусле с 5% ДМСО, скорость охлаждения 7град/мин.

летальных повреждений, которые возникают в процессе криоконсервирования.

Представленные в данном разделе работы результаты исследований, проведенные в отделе ДХБО при НТ и КМ, позволили разработать технологии криоконсервирования промышленных штаммов микроорганизмов: дрожжей *S. boulardii*, иммобилизованных на углеродсодержащих энтеросорбентах; дрожжей *S. cerevisiae*, иммобилизованных в гранулах геля альгината натрия с покрытием из альгината кальция; бактерий *B. bifidum* и *L. bulgaricus*; аспорогенных анаэробных бактерий *B. fragilis*, *P. melaninogenica*, *F. necroforum*, *M. curtisii*, *P. niger*, *P. anaerobius*, *V. parvula*; дрожжеподобных грибов *C. albicans*. Эти технологии успешно применяются в Низкотемпературном банке ИПКиК НАН Украины и ряда других научных учреждений.

Авторы выражают признательность профессору кафедры клинической иммунологии и микробиологии ХМАПО МОЗ Украины С.В. Бирюковой и заведующему лаборатории патофизиологии и иммунологии и патоморфологии ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины» А.П. Белозорову за методическую помощь в проведении экспериментов.

Литература

1. Артуянц А.Ю., Марценюк В.Ф., Высеканцев И.П. Содержание реактивных форм кислорода в клетках Candida albicans после криоконсервирования по различным программам // Вісник проблем біології та медицини. – 2010. – Вип. 4. – С. 62–66.
2. Артуянц А.Ю. Теоретичне та експериментальне обґрунтування ефективних умов кріоконсервування дріжджоподібних грибів Candida albicans: Автореф. дис.. канд. біол. наук. – Харків, 2012. – 19 с.
3. Бабинец О.М. Применение иммобилизованных пробиотиков при экспериментальном дисбиозе и сепсисе у лабораторных мышей: Тези доповідей Південно-української науково-практичної конференції «Фундаментальні проблеми внутрішньої медицини – від молекули до практичного одужання». – Одеса, 2011. – С. 26.
4. Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф. Терапевтическое действие иммобилизованных пробиотиков Saccharomyces boulardii и Bifidobacterium bifidum при экспериментальном химиотерапевтическом дисбиозе, сопровождающемся транслокацией кишечной микрофлоры // Імунологія та алергологія: Наука і практика. – 2011. – №1. – С. 61.
5. Бабинец О.М. Сравнительное изучение терапевтического действия нативных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, при экспериментальном дисбиозе // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 221.
6. Высеканцев И.П., Бабинец О.М., Марценюк В.Ф., Шатилова Л.Е. Сравнительное изучение адсорбции стандартных маркеров и пробиотиков на энтеросорбентах // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип.1. – С. 58–62.
7. Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Кирилюк А.Л. и др. Современное состояние проблемы криоконсервирования аспорогенных анаэробных бактерий // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т.18, №4. – С. 423–425.
8. Гончарова Г.И., Селикова А.П., Лянная А.М. и др.. Бифифлора человека, ее нормализация и защитные функции // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 3.– С. 179–183.
9. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 143 с.
10. Григорьев А.В. Общие принципы формирования кишечного микробиоценоза человека // Медичний Всесвіт. – 2002. – Т. II, №1–2. – С. 1–5.
11. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты // Биотехнология . –2008. – Т. 1, №2. – С. 30–45.
12. Дисбиоз кишечника: Руководство по диагностике и лечению / Под. ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. – СПб.: ИнформМед, 2009. – 276 с.
13. Дранник Г.Н., Курченко А.И., Дранник А.Г. Иммунология системы слизистых, физиологическая микрофлора и пробиотики. – К.: ООО «Полиграф плюс», 2009. – 144 с.
14. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Г. та ін. Лабораторна діагностика гнійно–запальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними мікроорганізмами: Метод. рекомендації. – Харків, 2000. – 35 с.
15. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / Под. ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
16. Корочинский А.В., Верниковский В.В., Степанова Э.Ф. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // Успехи совр. естествознания. – 2010. – №5. – С. 34–38.
17. Куликов В.Ю., Семенюк А.В., Колесникова Л.И. Перекисное окисление липидов и холодовой фактор. – Новосибирск: Наука, 1988. – 192 с.
18. Криобиология и биотехнология / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1987. – 216 с.

19. Лиминова О.А., Федотова Л.Э., Садин А.В. Лекция для врачей. Клиническая фармакология биопрепаратов, применяемых для лечения дисбактериозов кишечника [Электронный документ] // [веб-страница] http://www.orto.ru/6_Paper/2_5_GKT/Disbakterioz_Ivanov.htm (31/01/2012).
20. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К. Ерошина – Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
21. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник / Под. ред. А.А. Воробьева. – М., 2004. – 691 с.
22. Николаев В.Г., Михайловский С.В., Турина Н.М. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, №4. – С. 3–17.
23. Підгорський В.С., Головач Т.М., Суденко В.І. Депонування мікроорганізмів при патентуванні винаходів та його наслідки для винахідника // Мікробіол. журнал. – 2001. – Т.63, №1. – С. 56–61.
24. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М. и др. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожей Saccharomyces cerevisiae, иммобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – Вип.2. – С. 14–17.
25. Сидякина Т.М. Методы консервации микроорганизмов. – Пущино, 1988. – 59 с.
26. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 288 с.
27. Сиренко А.Ю., Марценюк В.Ф., Петренко Т.Ф. Влияние режимов замораживания на адгезивные свойства криоконсервированных грибов Candida albicans // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 14–16.
28. Холодовой стресс и биологические системы / Под. ред. А.А. Цуцаевой.– К.: Наук. думка, 1991. – 176 с.
29. Чубенко С.С., Чубенко Д.С. Клиническая эффективность S. boulardii в профилактике и лечении дисбактериоза // Здоров'я України. – 2006. – №2–1. – С. 6–9.
30. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004.– 2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003.
31. Пат. 2118535 Российская Федерация, МПК A61K 35/74, C12N 11/14. Комплексный бактериальный препарат / Бородин Ю.И., Бурмистров В.А., Гуськов А.А. и др.; заявитель и патентообладатель Ин–т клин. и эксперим. лимфологии СО РАМН, ЗАО «Вектор-Бест» – №97104352/13; заявл. 20.03.1997; опубл. 10.09.1998, Бюл. №25.
32. Пат. 2164801 Российская Федерация, МПК7 A61K 35/74. Препарат-пробиотик в сухой иммобилизованной форме / Молокеев А.В., Никулин Л.Г., Ильина Р.М. и др.; заявитель и патентообладатель дочернее гос. унитарное эксперим. производ. предприятие «Вектор-Биальгам»; заявл. 06.12.1999; опубл. 10.04.2001, Бюл. №10.
33. Пат. 56674 Україна, МПК C12 N1/04. Спосіб консервування культури Bifidobacterium bifidum ЛВА–3 / Ананьїна Г.Є., Гольцев А.М., Висеканцев І.П. та ін.; заявник і патентовласник ІПКіК НАНУ; заявл. 18.06.2010; Опубл. 25.01.2011, Бюл. №2.
34. Abstracts of XXXII International Congress of the Society for Ecology and Disease (October 29–30, 2009, St. Petersburg, Russia): Материалы 6-й объединенной научной сессии и 2-го Международ. конгресса по пробиотикам, (Санкт-Петербург, 28–29 октября) // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – №4. – А1-А32, М1-М48.
35. Billoo A.G., Memmon M.A., Khaskheli S.A. et al. Роль пробиотиков Saccharomyces boulardii в лечении и предупреждении диареи // Новости медицины и фармации в мире. – 2011. – №13–14. – С. 10–11.
36. Baumann D.P. Preservation of lactic cultures. – Cambridge: University Microfilms, 1996. – 127 p.
37. Cathcart R., Schwiers E., Ames B.N. Detection of picomol levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay // Anal. Biochem. – 1983. – Vol. 134, №1. – P. 111–116.

38. Edwards-Ingram L., Gitsman P., Burton N. et al. Genotypic and physiological characterization of Saccharomyces boulardii, the probiotic strain of Saccharomyces cerevisiae // Applied and Enviromental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, №8. – P. 2458–2467.
39. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // J. Immunol. – 1992. – Vol. 148. – P. 2207–2216.
40. Farrant J., Walter C. A., Heather L., McCann L.E. Use of two-step cooling procedures from examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, №3. – P. 273–286.
41. Fuller B.J. Cryoprotectants: the esseutial antifreezes to protect life in the frozen state // Cryoletters. – 2004. – Vol. 25, №6. – P. 375–388.
42. Fuller B.J., Lane N.J., Benson E.E. Life in the frozen state. – New York: CRS Press., 2004. – 672 p.
43. Gibson G.R., Robertson M.B. Colonic microbiota nutrition and health. – Dordrecht: Klawer Academic, 1999. – 304 p.
44. Gill H.S., Guarner F. Probioties and human heals: a clinical perspective // Postgrad. Med. J. – 2004. – №80. – P. 516–526.
45. Hoffmann P. Cryopreservation of fungi // World J. Microbial. Biotechnol. – 1991. – Vol. 7, №1. – P. 92–94.
46. Hubalek Z. Cryopreservation of microorganisms at ultra-low temperatures. – Praha: Academia Praha, 1996. – 286 p.
47. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. – 2003. –Vol.46, №3. – P.205–229.
48. King C.J. Application of freeze-drying to food prodacts: freeze-drying and food technology. – London: Acad. Press, 1975. – P. 338–350.
49. Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. Getting better with bifidobacteria // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 98, №6. – P. 1303.
50. Lee J.S. Cha D.S., Park H.J. Survival of froze-dried Lactobacillus bulgaricus KFRI 673 in clutozan coated calcium alginate microparticles // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, №24. – P. 7300–7305.
51. Le Tien C., Millette M., Mateescu M.A., Lacroix M. Modified alginate and ehitosan for lactic acid bacteria immobilization // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2004. – Vol. 39, №3. – P.347–354.
52. Ljungdal L.G., Adams M.W., Barton L.L. et al. Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria. – New York: Springer-Verlag, 2003. – 270 p.
53. Matthes G., Hackensellnes H.A., Richter E. The role of lipid peroxidation as a factor of cryoinjury // Cryobiology. – 1983. – Vol. 20, №6. – P. 726–731.
54. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell. Res. – 1972. – Vol. 71. – P. 345–355.
55. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cell cooled of supraoptimal rates // Cryobiology. – 1977. – Vol. 19, №3. – P. 251–272.
56. Meryman H.T., Willams R.J., Douglas M.S. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, №3. – P. 287–302.
57. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying: Areviera // J. Microbiol. Meth. – 2006. – Vol. 66, №2. – P. 183–193.
58. Op den Kamp J.A. Lipid asymmetry // Ann. Rev. Biochem. – 1979. –Vol. 48. – P. 47.
59. Philipott N.J., Turner A.J., Scopes J. et al. The use of 7-aminoactinomycin D identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other technicues // Blood. – 1996. – Vol. 87, №6. – P. 2244–2251.

60. Shen T.J., Marshall R.T., Heymann H. Improving survival of culture bacteria in frozen dessert by microentrupment // J. Dairy Sci. – 1993. – Vol. 76, №7. – P. 1902–1907.
61. Stalpers J.A., Vlug I.J. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen // Mycologia. – 1987. – Vol. 79, №1. – P. 82–89.
62. Tsen J.H., Huang H.Y., Lin Y.P., King V.A.E. Freezing resistance improvement of Lactobacillus reuteri by using cell immobilization // J. Microbiol. Methods. – 2007. – Vol. 70, №3. – P. 561–564.
63. The Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purpose of patent procedure and regulations. – Geneva: Wipo, 1989. – 53 p.
64. Urbanska A.M., Bhathena J., Prakash S. Live encapsulated Lactobacillus acidophilus cells in yoghurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2007. – Vol. 85, №9. – P. 884–893.

Современные подходы к гипотермическому хранению изолированных органов

Д.В. Черкашина[1]*, А.Ю. Петренко[1], Б.Дж. Фуллер[2], К.Дж. Грин[3], О.А. Семенченко[1], А.Ю. Сомов[1], И.А. Сосимчик[1], Е.Н. Ткачева[1]

[1]Отдел криобиохимии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
электронная почта: daria_cherkashina@ukr.net
[2]University Department of Surgery and Liver Transplantation Unit
Royal Free and University College Medical School
London NW3 2QG UK
[3]Northwick Park Institute for Medical Research
Harrow HA1 3UJ UK

1. Гипотермия как единственный способ сохранения целого органа – преимущества и недостатки

Несмотря на бурное развитие медицины и биологии, трансплантация донорских органов во многих случаях остается единственным способом спасения жизни пациентов. Спектр патологических состояний, приводящих к органной недостаточности, достаточно широк, начиная от генетически детерминированных заболеваний и заканчивая злокачественными новообразованиями. В настоящее время успешно осуществляется трансплантация почек, печени, сердца, легких, тонкого кишечника и поджелудочной железы. Несомненно, наиболее предпочтительными являются органы или их части, полученные непосредственно перед трансплантацией от близких родственников или живых доноров. Однако следует учитывать снижение общего количества доноров на фоне увеличиваю-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 441–468.
© Д.В. Черкашина, А.Ю. Петренко, Б.Дж. Фуллер и др., 2012

щегося с каждым годом числа пациентов, требующих подобного вмешательства, а также высокий уровень смертности в «очереди ожидания» (согласно статистическим данным средний срок ожидания органов возрос с 1989 года более чем в 10 раз). В данном случае «источниками» органов являются доноры с диагностированной смертью мозга или нерегистрируемой сердечной деятельностью, а также люди пожилого и старческого возраста. Два последних источника относятся к группе повышенного риска – так называемым «маргинальным» донорам. Важнейшие факторы успешного исхода трансплантации в этих случаях, помимо адекватного подбора пары донор-реципиент, – это поддержание функции и сохранение полноценности органа в период его «изолированности». Эта проблема особенно актуальна при необходимости транспортировки биообъекта или длительной подготовки реципиента.

На современном уровне развития науки существует единственный способ сохранения изолированного органа в течение некоторого времени – гипотермия, т. е. использование околонулевых положительных температур. Подобный подход обусловлен несколькими причинами. Так, снижение температуры от 37 до 0°С, согласно правилу Вант-Гоффа и уравнению Аррениуса, эффективно обеспечивает замедление метаболических процессов приблизительно в 5 раз. При этом полной остановки метаболизма не происходит, что, с одной стороны, способствует поддержанию функции, а с другой – препятствует развитию необратимых нарушений. Охлаждение столь высокоорганизованных структур, какими являются органы, до околонулевых, но все же положительных температур, предупреждает образование льда. Подобный подход позволяет частично сохранить систему межклеточных взаимодействий, разрушение которых становится в дальнейшем причиной неспособности органа как интегральной структуры адекватно реагировать на происходящие с ним изменения.

Не вызывает сомнений, что реакция различных органов на манипуляции при подготовке к трансплантации – индивидуальна, так как обусловлена особенностями строения и клеточного состава. Тем не менее, для всех характерен универсальный каскад событий, приводящих к развитию повреждений. Общепринятым для обозна-

чения комплекса изменений, происходящих в органе на всех этапах манипуляций с ним (начиная от собственно изоляции и заканчивая посттрансплантационным периодом) является термин «ишемически-реперфузионные повреждения». При этом можно выделить краткосрочную тепловую ишемию при получении органа, более длительную холодовую ишемию при его гипотермическом хранении (ГХ) и тепловую реоксигенацию при возвращении в физиологические условия (реперфузия в модельной системе или реваскуляризация при трансплантации). В свою очередь, в каскаде ишемически-реперфузионных повреждений можно условно выделить несколько этапов, несомненным «инициатором» которых является сосудистая реакция. Именно сосуды, особенно при высоком уровне васкуляризации, характерном для всех основных объектов трансплантации, принимают на себя «первый удар» уже в момент изоляции органа. Дальнейшее охлаждение, сопровождающееся ишемией, усугубляет повреждение эндотелиальных клеток сосудов, что обусловлено их высокой чувствительностью к гипоксии и изменениям микроокружения [18]. При возвращении в физиологические условия, буквально на первых минутах реоксигенации, происходят отслаивание и необратимое повреждение этих клеток, которые становятся причиной нарушения микроциркуляции в органе и образования очагов некроза [19, 93, 103]. Кроме того, на развитие сосудистой реакции влияет нарушение баланса между вазоконстрикторами (эндотелиальный фактор роста, эндотелин-1) и вазодилаторами (NO), синтезируемыми эндотелиальными клетками [46, 72].

Важнейшими стимуляторами ишемически-реперфузионных повреждений являются резидентные макрофаги, например, клетки Купфера в печени, и другие иммунокомпетентные клетки органов. Активация этих клеток происходит уже на этапе гипоксии, а реализация основных эффектов – после возвращения в физиологические условия, особенно после трансплантации в результате взаимодействия с иммунной системой реципиента. Активированные тканевые макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли α, ИЛ-1 и 6, трансформирующий фактор роста β, молекулы адгезии и хемокины), а также играют важную роль в развитии оксидативного повреждения органа [49, 89]. Существенный вклад в свободнорадикальные процессы иммунокомпетентные

клетки вносят после длительной холодовой ишемии, которая значительно усиливает чувствительность всех типов клеток к стрессорным воздействиям, в том числе и к действию прооксидантов [106].

Таким образом, нарушение нормальной клеточной кооперации – это основная причина необратимых повреждений изолированного органа в ходе хранения и последующей нормотермической реперфузии (НР), которые приводят к патологическим изменениям работы клеток, выполняющих главную функцию в органах (гепатоциты, кардиомиоциты, нефроны и т.д.). На клеточном уровне мишенями повреждающих факторов являются:

– плазматическая и внутриклеточные мембраны, нарушение избирательной проницаемости которых приводит к дезорганизации работы клетки и метаболических процессов вследствие изменения ионного окружения [51];

– дыхательная цепь митохондрий и АТФ-генерирующий аппарат [62];

– баланс между прооксидантными и антиоксидантными системами клетки [52].

К наиболее ранним проявлениям повреждающего действия гипоксии относится нарушение регуляции осмотического давления. Поддержание объема клетки зависит от величины pH цитозоля, которая резко уменьшается в процессе ГХ органа, а затем восстанавливается до нормальных значений при реперфузии. Снижение уровня pH обусловлено «переключением» клеток на анаэробный гликолиз как основной источник энергии, конечным продуктом которого является лактат. Такое изменение pH при ишемии считается адаптацией к стрессу, благодаря инактивации щелочных гидролитических ферментов, однако при этом также угнетается активность ферментов, имеющих нейтральный оптимум. Эти явления названы «pH-парадоксом» и служат одной из причин нарушения работы митохондрий – основного поставщика энергии при аэробном метаболизме [40, 61].

Низкая внутриклеточная концентрация свободного кальция – это еще один важнейший фактор поддержания ионного гомеостаза и условие сохранения жизнеспособности клеток. Гипоксия и резкое

охлаждение индуцируют повышение содержания Ca^{2+} в цитоплазме [44], которое при последующей реоксигенации приводит к необратимым изменениям в клетках и является одним из механизмов активации процессов клеточной смерти [36]. Такое повышение происходит путем мобилизации кальция из основных внутриклеточных депо – митохондрий и эндоплазматического ретикулума.

Повреждения, вызванные нарушением обмена кальция, проявляются при возвращении органа в физиологические условия. Реоксигенация повышает проницаемость плазматической мембраны для Ca^{2+} после ГХ, что вызывает снижение уровня внутриклеточного калия [59]. Концентрация цитоплазматического Ca^{2+} повышается на фоне реполяризации внутренней мембраны митохондрий, восстановления протонного градиента и работы кальциевого унипорта. Ионы кальция интенсивно закачиваются в митохондрии и, когда их концентрация достигает патологически высокого уровня, резко изменяется проницаемость мембран для небольших молекул («mitochondrial permeability transition») [95]. Это снова приводит к падению мембранного потенциала, разобщению окислительного фосфорилирования, потере адениновых нуклеотидов и других молекул.

Дисфункция митохондрий играет ключевую роль в развитии ишемически-реперфузионных повреждений органов, поскольку эти органеллы участвуют как в поддержании энергетического баланса, так и в свободнорадикальных процессах. В целом можно выделить три основных фактора нарушения функции митохондрий: протонная утечка сквозь внутреннюю мембрану митохондрий, изменение активности дыхательных комплексов и дефицит субстратов дыхания [105].

В процессе холодовой ишемии, при недостатке кислорода для работы дыхательной цепи митохондрий, нарушаются перенос электронов, процессы окислительного фосфорилирования и работа цикла трикарбоновых кислот. При этом происходит сдвиг редокс-равновесия в сторону восстановленных соединений, что приводит к накоплению НАДН [95]. Гипоксическая активация анаэробного гликолиза позволяет некоторое время поддерживать уровень АТФ, однако избыток его конечного продукта – лактата, а также исчерпание пула гликогена приводят к угнетению этого метаболического

пути [38, 80]. В результате уровень АТФ в клетках начинает уменьшаться, усиливается его деградация с образованием адениновых нуклеотидов: АДФ, АМФ, аденозина, превращающихся затем в аденин, инозин и гипоксантин. При длительной ишемии окислительная способность дыхательной цепи снижается, а степень тяжести повреждений напрямую связана с продолжительностью воздействия. При этом митохондрии утрачивают способность к окислению НАД-зависимых субстратов, снижаются скорость АДФ-стимулированного дыхания и дыхательный контроль, характеризующий сопряжённость дыхания и фосфорилирования [33]. Для постишемического периода характерно увеличение скорости дыхания в состоянии 4, которая отражает протонную проницаемость внутренней мембраны митохондрий [26, 96].

Кроме нарушения энергетической функции, митохондрии при ишемии-реоксигенации становятся основным источником активных форм кислорода (АФК) в клетках [35, 79], вследствие ингибирования дыхательной цепи и повышения степени восстановленности её переносчиков, что увеличивает вероятность паразитного одноэлектронного восстановления кислорода при реоксигенации [91]. В дыхательной цепи супероксиданион образуется на уровне I и III комплексов в результате миграции протона между убихиноном, цитохромами *b* и *c*1, а также железосерным белком [98, 99]. Образовавшийся супероксиданион превращается с помощью Mn^{2+}-супероксиддисмутазы в перекись водорода, которая, в отличие от O^{2-}, способна диффундировать через мембрану, что приводит к распространению оксидативного повреждения за пределы митохондрий. В норме образуемые в митохондриях АФК утилизируются при помощи глутатионпероксидазы, однако в условиях ишемии-реперфузии восстановленный глутатион транспортируется из клеток для защиты сосудов от свободных радикалов, продуцируемых активированными иммунокомпетентными клетками [52], что является одной из причин развития внутриклеточного оксидативного стресса.

Ещё одним источником АФК в клетках служит ксантиндегидрогеназная-ксантиноксидазная система, ее субстратами являются ксантин и гипоксантин, образующиеся при деградации адениновых

нуклеотидов. В этом процессе также высвобождается супероксид-анион, который превращается в более реакционноспособные формы – перекись водорода и гидроксильный радикал [53]. В данном случае ситуация усугубляется параллельной активацией индуцибельной изоформы синтазы оксида азота (II), который легко взаимодействует с супероксидом, образуя высокотоксичный пероксинитрит [3].

Стремительное увеличение количества свободных радикалов в клетках при ишемии-реперфузии должно сдерживаться системой антиоксидантной защиты, однако нарушения в ее работе происходят уже на этапе холодового хранения. Наиболее чувствительной является каталаза, что обусловлено ее сложной надмолекулярной структурой [90], более устойчива – глутатионпероксидаза, хотя продление сроков ишемии приводит к угнетению и ее активности, а также изменению локализации внутри клетки [55]. Снижение активности митохондриальной изоформы глутатионпероксидазы на фоне падения содержания восстановленного глутатиона является критическим, так как нарушается процесс утилизации супероксид-аниона [39]. Кроме того, угнетение активности всех форм супероксиддисмутазы, в том числе и митохондриальной [43, 90], также играет важную роль в развитии внутриклеточного оксидативного стресса, что обусловлено важностью контроля генерации свободных радикалов митохондриями при ишемически-реперфузионных повреждениях [87].

Мультифакторное повреждение клеток при ишемии и реперфузии приводит к развитию необратимых летальных нарушений. В настоящее время основную роль в гибели клеток при ишемии-реперфузии отводят апоптозу [51]. Внутриклеточным источником апоптотических сигналов являются митохондрии. В них при нарушении ионного транспорта происходят набухание матрикса с перестройкой внутренней мембраны, затем разрыв внешней мембраны, а также выход цитохрома *c* и других факторов, активирующих апоптоз клеток [24]. При вовлечении в процесс повреждения иммунокомпетентных клеток ключевыми проапоптотическими сигналами становятся истощение пула восстановленного глутатиона и усиление экспрессии фактора некроза опухоли α, повышение чувстви-

тельности клеток к которому опосредуется свободными радикалами [102, 104].

Таким образом, холодовая ишемия и последующая тепловая реоксигенация приводят к каскаду метаболических и функциональных нарушений в изолированных органах, что обуславливает необходимость поиска способов предупреждения и защиты от этих повреждений, а также поддержания полноценности биообъектов до трансплантации.

2. Общепринятые подходы к гипотермическому хранению органов, консервирующие растворы и принципы их создания

До недавнего времени единственным способом ГХ изолированных органов являлось статическое (простое) холодовое хранение (simple cold storage). На сегодняшний день разработаны новые динамические подходы, наиболее перспективным из которых представляется гипотермическая машинная перфузия. Основной ее принцип заключается в сочетании холодового торможения метаболизма с постоянным снабжением органа кислородом и питательными веществами, а также удалением токсических продуктов и поддержанием гемодинамической функции [110]. Кроме того, положительные эффекты машинной перфузии связывают с регуляцией активности ряда противовоспалительных факторов, а также способностью восстанавливать энергетический потенциал клеток, сдерживать свободнорадикальные процессы и поддерживать функциональную активность органа [38, 97]. Помимо этого, к перфузионным методам относят нормотермическую машинную перфузию и воздушную персуфляцию (oxygen persufflation) [42].

Однако в клинической практике гипотермическую машинную перфузию используют только для хранения почек, а для печени, легких, сердца и поджелудочной железы – только статическое ГХ [60]. Все остальные подходы находятся в стадии доклинической разработки или клинических испытаний.

В связи с этим мы остановимся на общепринятом классическом способе – простом холодовом хранении, успешный исход которого, несомненно, обеспечивается не только качеством органа, но и адекватным составом консервирующего раствора.

Среда для хранения органов должна быть способна поддерживать осмотическое давление, предупреждать нарушения ионного и энергетического баланса, сдерживать процессы образования или эффективно нейтрализовать токсические метаболиты, в том числе АФК и свободные радикалы, и в целом обеспечивать структурно-функциональную целостность органа, благодаря обеспечению полноценности метаболических процессов.

Существующие консервирующие растворы можно условно разделить на два типа: вне- и внутриклеточные. На начальных этапах развития трансплантологии использовали раствор внеклеточного типа – Рингер-лактат, обеспечивавший сохранение органа не более 6 ч [54]. В 1969 году G.M. Collins разработал простой и эффективный раствор внутриклеточного типа («Euro-Collins»), который был усовершенствован в 1976 году [32] и до сих пор используется для хранения почек. В 80-х гг. 20-го века был разработан раствор Университета Висконсин (UW), который вытеснил из клинической практики «Euro-Collins», показав свою более высокую эффективность в ряде исследований [78]. Он считается «золотым стандартом» сред для ГХ органов [73]. Среда UW эффективна для хранения сердца, лёгких, печени, почек и поджелудочной железы [42]. В ее состав входят такие непроникающие осмотически активные компоненты, как лактобионат, раффиноза и гидроксиэтилированный крахмал, использование которых предотвращает набухание клеток в период холодового хранения. Кроме того, среда UW включает вещества, участвующие в сдерживании свободнорадикальных процессов (восстановленный глутатион и аллопуринол) и стимуляции образования высокоэнергетических фосфатов (аденозин) [48].

Наряду с этим, H.I. Bretschneider разработал кардиоплегический раствор для ГХ сердца («Custadiol», НТК, содержащий гистидин, триптофан и кетоглутарат), который оказался эффективным и для хранения других органов [42, 50]. В отличие от раствора «Euro-Collins», НТК характеризуется низким содержанием ионов натрия и калия, а также высоким содержанием гистидина, обладающего значительной буферной ёмкостью. Эта среда позволяет сохранить функцию органа и демонстрирует низкий процент осложнений после трансплантации при условии, что продолжительность ГХ не превышает 12–18 ч.

В 1994 году был разработан раствор «Celsior», совмещающий осмотическую эффективность UW (за счет лактобионата и маннитола) и буферную ёмкость HTK (благодаря гистидину). Его используют для хранения сердца, печени и почек [75]. Кроме того, в последнее время появилось несколько консервирующих растворов: среда Института Джордж-Лопез (IGL-1) – комбинация UW и «Celsior» [21]; «Polysol», в состав которого, помимо классических компонентов, входят полиэтиленгликоль, глюконаты, аскорбат, токоферол, аденин, пируват и др. [108]; раствор CZ-1 (№1 Changzheng Organ Preserving Solution), который представляет собой комбинацию UW с декстраном и сахарозой, его эффективность показана в эксперименте для всех видов трансплантируемых органов, а в клинике – для почек [111]; кардиоплегический раствор «Somah», разработанный в Гарвардской медицинской школе, дополненный широким спектром биологически активных компонентов (цитруллин, орнитин, карнозин, карнитин и т.д.) [101].

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины также был разработан консервирующий раствор на основе непроникающего осмотически активного компонента – сахарозы [16]. Его эффективность показана для длительного ГХ как изолированных клеток (фетальных клеток и гепатоцитов) [7, 88], так и целого органа (печени, сердца и почек) [6, 41]. На модели долгосрочного ГХ печени (24 ч) установлено, что функциональная активность митохондрий, а также энергетический и прооксидантно-антиоксидантный баланс в органе находятся на уровне показателей, полученных при использовании общепринятого UW [5, 96]. Эти факты, а также более низкая по сравнению с UW себестоимость сахарозо-солевого раствора (ССР) свидетельствовали о перспективности его дальнейших исследований.

Несмотря на эффективность, возможность применения ССР в клинической практике лимитирована присутствием в его составе бычьего сывороточного альбумина, используемого для поддержания осмотического давления и связывания токсических продуктов. Причинами ограничения сферы применения альбумина являются его высокая иммуногенность, повышение склонности к закупорке мелких капилляров, а также снижение эффективности пропускания

газовых смесей через раствор для создания достаточных значений парциального давления для CO_2 и O_2 [67]. Кроме того, важной проблемой был выбор оптимальной буферной системы в качестве основы ССР. Используемый в первоначальном варианте раствора Трис-HCl-буфер, к сожалению, обладает высокой цитотоксичностью и стимулирует тромбообразование, в связи с чем его применение в клинической практике неприемлемо [71].

Учитывая требования, выдвигаемые к указанным компонентам, в частности способность альбумина поддерживать осмотическое и онкотическое давление, а также стабилизировать вязкость раствора, в качестве альтернативы данному биополимеру был выбран синтетический полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000, а для замены Трис-HC1-буфера – фосфатный. Мы провели серию сравнительных экспериментов, в которых поэтапно заменяли существующие и исследуемые компоненты в составе ССР. Оценив на модели ГХ печени (18 ч) показатели перекисных процессов, уровень АТФ в органе и маркеры повреждения в перфузате, мы установили, что подобная модификация ССР не уступает традиционному составу, но при этом значительно расширяет спектр его возможного применения. Полученные данные легли в основу Патента Украины [15], и в дальнейших исследованиях мы использовали модифицированный ССР [4, 9–11, 77].

Несмотря на несомненный прогресс в области создания мультикомпонентных растворов для длительного ГХ изолированных органов, его продолжительность по-прежнему ограничивается 4–16 ч в зависимости от вида и исходного состояния органа. В дальнейшем наблюдаются необратимые метаболические нарушения, влекущие за собой как ранние, так и отдаленные посттрансплантационные осложнения, нередко сопровождающиеся летальным исходом. Таким образом, вопрос эффективной защиты изолированных органов, в том числе и печени, от ишемически-реперфузионных повреждений, остаётся открытым. В связи с этим существует необходимость разработки комплексных подходов для решения задач, связанных с продлением сроков ГХ печени и сохранением функциональной активности, а также минимизацией повреждения органа при возвращении в физиологические условия.

3. Перспективные подходы к продлению сроков безопасного хранения изолированных органов

Применяемые в современной экспериментальной и клинической трансплантологии пути коррекции ишемически-реперфузионных повреждений условно можно разделить на физические, химические (фармакологические) и биологические.

К первому типу относится активно исследуемая пред- и постишемическая обработка органов. Отнесение данных подходов к физическому типу воздействия обусловлено способом их реализации, а именно механической окклюзией сосудов без использования каких-либо других модуляторов состояния.

Ишемическая предобработка (ischemic preconditioning) органа проводится до хранения и обеспечивается краткосрочным зажиманием сосудов с последующим восстановлением кровотока. Данный подход предотвращает нарушение функции митохондрий, падение уровня адениновых нуклеотидов и их деградацию [83].

В последнее время появилось такое понятие, как ишемическая постобработка органа – краткосрочные прерывающиеся периоды реокклюзии сосудов перед началом длительной реперфузии [109]. Медленная скачкообразная предварительная реоксигенация органа после периода ишемии позволяет уменьшить «взрыв» продукции АФК при поступлении кислорода, активирует антиоксидантные ферменты и «скавенджеры» свободных радикалов, а также снижает количество апоптотических клеток. Согласно литературным данным [31, 109] механизмы защитного действия пост- и предобработки отличаются незначительно, главная роль в них отводится аденозину, активации внутриклеточных сигнальных путей и предотвращению повышения проницаемости мембран митохондрий.

Исследования в сфере применения химических и биологических агентов можно разделить по способу их использования: подготовка донора и/или дополнение раствора хранения/реперфузии тестируемым веществом. Первый способ, по понятным причинам, имеет этические ограничения при постмортальной донации, однако очень перспективен в случае прижизненного донорства парных органов или частичной трансплантации печени. Недостатками второго способа применения могут быть снижение эффективности

проникновения агента в ткань при низких температурах и невозможность контролировать этот процесс.

К группе химических агентов относится широчайший спектр веществ. Использование в данном случае термина «фармакологические» также абсолютно уместно, так как конечным результатом любых исследований в области разработки растворов для ГХ органов является внедрение созданных протоколов в клиническую практику. При этом каждая используемая субстанция должна быть внесена в перечень разрешенных к применению препаратов, т. е. быть «фармакологичной». По аналогичным соображениям к этой категории можно отнести и обширную группу веществ природного происхождения, в основном растительного, начиная от известного флавоноида силибинина [81] и заканчивая экстрактом зеленого чая [64].

Обобщая все наиболее распространенные подходы, можно выделить основные мишени для воздействия химических модифицирующих агентов – это энергетическая функция и прооксидантно-антиоксидантный баланс. Проблема регуляции ионного гомеостаза обычно решается на уровне базового состава консервирующего раствора, а попытки воздействовать на опосредованные цитокинами и другими биомолекулами изменения будут рассмотрены в последней части данной работы.

Для сохранения энергетического статуса клеток применяют различные пиридиновые производные, которые, помимо поддержания содержания макроэргов, препятствуют гиперпродукции провоспалительных цитокинов и развитию оксидативного стресса путем индукции противовоспалительных стрессорных белков [37, 102]. Также значительным протекторным действием при ишемии-реперфузии обладают субстраты и продукты ключевых реакций гликолиза: пируват [94], фосфоенолпируват [84] и глюкозо-1,6-бисфосфат [47], которые предупреждают активацию клеток Купфера и поддерживают энергетический статус клеток печени.

Согласно современным представлениям, нарушение работы митохондрий – один из критических факторов развития ишемически-реперфузионных повреждений, поэтому предупреждение их дисфункции, несомненно, также является перспективным путем повышения сохранности органа после ГХ.

Известно, что основная причина дисфункции митохондрий при холодовой ишемии и последующей реперфузии – это нарушение транспорта электронов, которое приводит к существенному усилению продукции АФК. Исследовательская группа В.П.Скулачёва на основании экспериментов, демонстрирующих зависимость скорости генерации АФК дыхательной цепью от величины электрохимического мембранного потенциала, выдвинула гипотезу «мягкого разобщения», согласно которой снижение избыточного мембранного потенциала под действием разобщителей окислительного фосфорилирования должно приводить к угнетению продукции АФК [92].

Основываясь на этой гипотезе, мы исследовали влияние классического разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола (ДНФ) в качестве компонента ССР на развитие ишемически-реперфузионных повреждений печени после ГХ. В данном случае мы считали необходимым удалить разобщитель после хранения перед НР, для чего использовали 1%-й раствор альбумина, способного неспецифически связывать гидрофобные вещества.

При выборе оптимальной концентрации ДНФ в растворе хранения критериями эффективности являлись разобщение окислительного фосфорилирования на этапе хранения и его восстановление после отмывки. В результате была выбрана конечная концентрация ДНФ – 100 мкМ. При ее использовании было показано, что присутствие разобщителя в растворе хранения оказывало благоприятный эффект на состояние печени после 18 ч ГХ, что проявлялось в снижении интенсивности свободнорадикальных процессов и предупреждении угнетения активности ферментов системы антиоксидантной защиты печени [14, 77]. Кроме того, разобщитель оказывал защитное действие на сопряжённость окислительного фосфорилирования, сохраняя дыхательный контроль и содержание АТФ на высоком уровне [13, 77]. Особенно выражен позитивный эффект был после НР, что подтвердило необходимость удаления разобщителя перед реоксигенацией. Ярким подтверждением результатов биохимического анализа явились восстановление скорости желчеобразования в печени до исходного уровня и улучшение ее морфологической структуры [77].

Полученные результаты подтвердили эффективность «мягкого разобщения» окислительного фосфорилирования и свидетельствуют о перспективности применения веществ с подобным механизмом действия для коррекции ишемически-реперфузионных повреждений печени. Дальнейшее же применение ДНФ в клинике, несмотря на полученные обнадеживающие результаты, ограничено его высокой токсичностью [34]. Эти факты обусловили необходимость поиска веществ, обладающих разобщающими свойствами, но не имеющих «противопоказаний» к применению. На данном этапе одним из основных критериев выбора агента, помимо механизма действия, была его принадлежность к лекарственным препаратам, что в перспективе определяет возможность применения в клинике.

Наше внимание привлёк бенциклана фумарат (БФ) –действующее вещество фармакологического препарата «Галидор®» («Egis», Венгрия), который относится к группе миотропных спазмолитиков и применяется при лечении хронического эндартериита и других нарушений кровообращения. Предполагается, что БФ, разобщая окислительное фосфорилирование, создаёт дефицит АТФ для сократительной функции мышечных волокон, что и обуславливает сосудорасширяющее и антиспастическое действие препарата [2]. Кроме того, на модели ишемии кишечника показано, что разобщение БФ процессов дыхания и окислительного фосфорилирования позволяет нормализовать прооксидантно-антиоксидантное состояние [20].

Мы провели эксперименты на изолированных митохондриях, которые позволили определить диапазон концентраций БФ для ГХ целого органа, составивший 0,05–1 мМ. Показано, что внесение только 1 мМ БФ приводит к разобщению окислительного фосфорилирования. Именно эта концентрация и была использована в дальнейших экспериментах, схема которых аналогична схеме исследований с использованием ДНФ. Установлено, что в присутствии БФ после ГХ печени происходило разобщение окислительного фосфорилирования, которое сопровождалось повышением протонной проводимости мембраны митохондрий, что приводило к снижению дыхательного контроля. Последующая реперфузия усугубляла

данные изменения, приводя к необратимым нарушениям функции митохондрий. При этом содержание АТФ не изменялось. Добавление БФ в среду хранения позволяло снизить уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени как после ГХ, так и НР. При этом на этапе хранения предупреждалось падение каталазной и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активностей, а глутатионредуктазной – на всех этапах эксперимента [9].

Полученные результаты указывают на то, что разобщение окислительного фосфорилирования в процессе холодового хранения положительно влияет на прооксидантно-антиоксидантный баланс в печени, что, вероятно, связано со способностью разобщителей снижать продукцию АФК и предотвращать угнетение активности антиоксидантных ферментов. Однако наблюдаемое в случае БФ ослабление этого эффекта после реперфузии, сопровождающееся повышением протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий и чрезмерным снижением энергетического сопряжения, подтверждает наше мнение о необходимости удаления разобщителя из органа перед реоксигенацией. К такому заключению нам позволил прийти сравнительный анализ результатов, полученных при использовании БФ и ДНФ, так как основной защитный эффект последнего проявлялся уже после его отмывки и восстановления метаболических процессов на этапе НР. Мы считаем, что выявленные отличия обусловлены слабой способностью БФ связываться с белками [25], что снижает возможность его удаления из печени. Этот фактор ограничивает возможность применения БФ в качестве компонента консервирующего раствора.

Среди подходов, направленных на снижение интенсивности свободнорадикальных процессов при ишемии-реперфузии, можно выделить применение природных антиоксидантов прямого типа действия или их синтетических аналогов, таких как α-токоферол, аскорбат, ретинол и т. д. [82]. Согласно данным литературы, эффективность применения таких антиоксидантов повышается либо при их предварительном введении животным [76], либо при добавлении в реперфузионную среду [82]. Другим способом повысить антиоксидантный потенциал органов при хранении является применение восстановленного глутатиона или его предшествен-

ников [58]. Глутатион, как и ингибитор ксантиноксидазы – аллопуринол являются стандартными компонентами раствора UW [96].

Защитный потенциал антиоксидантов прямого типа действия резко снижается при внесении в раствор для ГХ [82]. Этот факт, по нашему мнению, обусловлен неспецифичностью их действия, что приводит к хаотичному распределению внутри клетки, без попадания в очаги генерации АФК, в том числе – митохондрии. В связи с этим нам представились перспективными исследования группы В.П. Скулачёва, которая синтезировала ряд веществ, названных SkQ. Они представляют собой производные пластохинона, конъюгированные с проникающими в митохондрии липофильными катионами. Эффективность этих соединений была исследована на искусственных бислойных мембранах, изолированных митохондриях, а также в культурах клеток и в системах *in vivo* [8]. Для наших экспериментов был выбран 10-(6-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний (SkQ_1), продемонстрировавший свою эффективность на моделях сердечной аритмии, ишемического инсульта и инфаркта почки и сердца, вызванного H_2O_2 и тепловой ишемией-реперфузией [1]. В ходе предварительных экспериментов из диапазона 0,5–5 мкМ в растворе хранения была выбрана оптимальная концентрация SkQ_1 – 1 мкМ. При этом была установлена дозозависимость наблюдаемого эффекта: базальный уровень продуктов ПОЛ снижался, начиная с 1 мкМ, а скорость их накопления – уже с 0,5 мкМ. Степень сопряжения окислительного фосфорилирования повышалась в присутствии 0,5 и 1 мкМ SkQ_1, а увеличение концентрации до 5 мкМ нивелировало этот эффект [4].

При дальнейших исследованиях установлено, что дополнение среды хранения 1 мкМ SkQ_1 в значительной степени улучшает состояние изолированной печени как после ГХ, так и НР. При этом наблюдали снижение спонтанной продукции АФК и интенсивности ПОЛ, а также повышение дыхательного контроля митохондрий и содержания АТФ в печени после 24 ч ГХ и НР. Все эти изменения сопровождались перестройками в антиоксидантной системе, в том числе происходило неожиданное угнетение глутатион-зависимой части, что не является характерным для действия любых агентов, направленных на сдерживание свободнорадикальных процессов [11].

Ярким подтверждением положительного влияния SkQ_1 на состояние печени после ГХ и НР была нормализация желчеобразующей функции и морфологии органа [11]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что митохондриально адресованный антиоксидант SkQ_1, использованный в качестве компонента консервирующего раствора, способен эффективно поддерживать сохранность изолированной печени при долгосрочном холодовом хранении. Вероятно, SkQ_1 настолько успешно аккумулируется митохондриями при околонулевых температурах, что его защитное действие продолжает реализоваться и на этапе НР раствором без антиоксиданта. Этот факт свидетельствует о достаточно высокой способности SkQ_1 проникать в клетки печени независимо от температуры.

Не вызывает сомнений перспективность представленных стратегий коррекции ишемически-реперфузионных повреждений печени, однако большой интерес в этой области представляют альтернативные, названные нами «биологические», подходы. К данному типу можно отнести применение биологически активных веществ, преимущественно белковой и пептидной природы, которые способны модулировать метаболическую, иммунологическую и другие активности разных типов клеток. Цитокины и ростовые факторы, независимо от их источника, представляются наиболее подходящими для таких целей, причем к ним мы относим как экзогенные факторы, так и эндогенно продуцируемые в ответ на воздействие. Таким образом, в диапазон применяемых биологически активных веществ входят отдельные ростовые факторы и цитокины, искусственные смеси выбранных агентов или «физиологические коктейли» природного происхождения.

Отдельную нишу в этой области исследований занимают антисыворотки и антагонисты рецепторов провоспалительных цитокинов, многие из которых хоть и имеют синтетическое происхождение, но, несомненно, оказывают исключительно биологический эффект. Сюда же могут быть отнесены различные иммуносупрессоры. Эффективность всех описанных вариантов показана на модели ишемии-реперфузии [23, 45], однако применение веществ с подобным механизмом действия носит спорный характер, так как при угнетении полноценной цитокин-опосредованной реакции

нарушаются репаративные процессы, реализующиеся после трансплантации. Оригинальным выглядит подход, заключающийся в предварительном введении донорам небольших доз провоспалительных цитокинов, что позволяет снизить последующее повреждение путем появления толерантности у клеток к действию эндогенно продуцируемых факторов. Эти эффекты опосредуются путем снижения количества рецепторов к провоспалительным цитокинам на поверхности клеток-мишеней [86].

Более оправданным представляется применение таких противовоспалительных цитокинов, как ИЛ-4, 10, 13 и ряда ростовых факторов, в том числе факторов роста гепатоцитов и фибробластов, эндотелиального и инсулиноподобного факторов и т. д. Данные вещества используются как для предобработки доноров «готовыми» белками, так и путем предварительной трансфекции их генов [56, 57, 65, 85, 100].

Долгое время основным способом применения агентов белковой и пептидной природы являлась предобработка доноров до изоляции органа. Нами также было проведено исследование эффективности цитозоля фетальных тканей (ЦФТ) мезенхимально-мезодермального происхождения после предварительного введения животным (за 4 ч до изоляции печени).

Выбор действующего агента был обусловлен несколькими причинами: фетальные ткани, в силу онтогенетических особенностей, являются источником широчайшего спектра биологически активных веществ; клетки мезенхимального происхождения, в свою очередь, занимают первое место среди продуцентов таких веществ [74]; стволовые и прогениторные клетки как в пренатальный, так и в постнатальный период характеризуются высокой устойчивостью к гипоксии [68], что, несомненно, должно обеспечиваться соответствующими механизмами; коктейль биорегуляторов в составе ЦФТ является «физиологичным» в отличие от любой искусственно созданной смеси.

Подобный подход позволил в значительной степени нормализовать прооксидантно-антиоксидантный баланс в органе после 24 ч ГХ и последующей НР, что обеспечивалось краткосрочным повышением уровня АТФ на фоне поддержания высокой активности гликолиза и стимуляции сукцинат-зависимого дыхания [28, 29].

В ходе экспериментов по выявлению возможных механизмов действия ЦФТ было обнаружено, что их частичная реализация происходит еще *in vivo*, до начала воздействия, путем модуляции редокс-зависимых процессов в печени. По нашему мнению, фетальные биорегуляторы осуществляют «подготовку» клеток, инициируя запуск механизмов срочной адаптации к стрессу [30].

В связи с ограниченной возможностью применения подобного подхода наше внимание привлекли исследования группы C.J. Murphy и J. McAnulty, продемонстрировавшие эффективность дополнения раствора для хранения печени и почек смесью трофических факторов (инсулиноподобного и эпидермального факторов роста, фактора роста нервов, бактеницина и вещества Р) [17, 66]. Особый интерес вызывали данные, касающиеся улучшения функции митохондрий и снижения интенсивности свободнорадикальных процессов. Были проведены эксперименты по определению эффективной концентрации ЦФТ в растворе хранения (расчет производили по общему содержанию белка в ЦФТ). В результате был выявлен дозозависимый характер действия ЦФТ как на перекисные процессы, так и функцию митохондрий: уровень продуктов ПОЛ снижался после НР уже в присутствии ЦФТ в дозе 20 мкг белка/мл раствора, при дальнейшем увеличении концентрации эффект усиливался и проявлялся также на этапе ГХ. В то же время дыхательный контроль митохондрий после ГХ и НР повышался, начиная с минимальной дозы ЦФТ (10 мкг белка/мл), однако при внесении 30 или 40 мкг белка/мл этот эффект нивелировался. По совокупности полученных результатов в качестве оптимальной была выбрана доза ЦФТ – 20 мкг белка/мл раствора [10].

Внесение в консервирующий раствор ЦФТ в дозе 20 мкг белка/мл оказывало выраженное защитное действие на прооксидантно-антиоксидантный баланс в печени, снижая скорость накопления продуктов ПОЛ и предупреждая угнетение активности антиоксидантных ферментов. Положительное влияние на энергетическое состояние печени проявлялось в сохранении степени сопряжения окислительного фосфорилирования и продукции АТФ на уровне свежеизолированного органа [10]. При этом наблюдалось значительное изменение содержания других адениновых нуклеотидов, в том числе снижался уровень АДФ и повышался – АМФ. Такая

реструктуризация пула высокоэнергетических фосфатов может служить еще одним свидетельством опосредованного действия компонентов ЦФТ, в данном случае – путем активации АМФ-зависимой протеинкиназы, участие которой в поддержании функции печени до трансплантации сейчас активно обсуждается [27].

Необходимо отметить, что при предварительном введении животным ЦФТ столь выраженного эффекта в отношении энергетического состояния печени не наблюдалось: степень сопряжённости митохондрий оставалась низкой даже после краткосрочного ГХ, а уровень АТФ повышался только после 1 ч хранения, а при продлении его сроков этот эффект нивелировался [12, 28]. Вероятно, механизм действия биорегуляторов во многом зависит от способа введения и температурного режима. В исследованиях мезенхимальных стромальных клеток особое внимание уделяется селективности их действия, то есть способности распознавать патологические очаги и направленно мигрировать к ним. Биологические эффекты этих клеток, как известно, в основном реализуются путем продукции биорегуляторов. В случае предобработки животных ЦФТ его эффекты в отношении «нативной» печени, как указывалось выше, реализуются путем запуска механизмов срочной адаптации к гипоксии, что подтверждается переключением дыхательной цепи митохондрий на сукцинатоксидазное окисление, активацией гликолиза и других немитохондриальных метаболических процессов [30]. При внесении в раствор хранения компоненты ЦФТ попадают в «поражённый» орган и, по-видимому, действуют на повреждённые в результате ишемии структуры, в том числе и митохондрии. При этом низкие температуры и общее замедление метаболических процессов не влияют негативно на эффекты регуляторных молекул, что подтверждается результатами работ, в которых раствор хранения дополняли смесью трофических факторов. Авторы утверждают, что внутриклеточные сигнальные пути активируются именно при низких температурах, при этом особое внимание в механизме действия подобных веществ отводится защите митохондрий [107].

Свидетельствами положительного влияния ЦФТ на органном уровне были как полное восстановление желчеобразующей функции, так и значительное улучшение морфологического состояния

печени после 24 ч ГХ и последующей НР [10], что свидетельствует о перспективности использования данного метода для холодового хранения печени.

Особое положение в предлагаемой классификации подходов к повышению степени сохранности изолированных органов занимают так называемые «газотрансмиттеры». К данной группе соединений относятся три эндогенно продуцируемых газа – NO, CO и H_2S. Эти соединения выполняют в организме роль вторичных мессенджеров, которые опосредуют различные типы сигналов, индукция которых осуществляется всеми типами рассмотренных нами агентов. Универсальными свойствами газотрансмиттеров является их способность к вазодилатации и миорелаксации, трансдукции сигналов ростовых факторов и цитокинов, взаимодействию между собой, а также высокая токсичность при превышении допустимых концентраций [22, 63, 70].

Наиболее изученным в данной области является оксид азота II (NO). Физиологические и сигнальные свойства оксида углерода II (CO) и сероводорода (H_2S), а также ферменты, их продуцирующие, были открыты только в 90-е годы 20-го века. Тем не менее все известные представители семейства газотрансмиттеров, независимо от источников и путей регуляции их уровня (при помощи экзогенных предшественников или активации эндогенной продукции), можно считать эффективными факторами для снижения ишемически-реперфузионных повреждений в изолированных органах [22, 69, 70]. Перспективность исследований в этом направлении не вызывает сомнений, так как до сих пор большинство молекулярных механизмов действия газотрансмиттеров остается неизвестным.

В заключение стоит отметить, что, несмотря на разнообразие стратегий сохранения функциональной полноценности изолированных органов до трансплантации, холодовое хранение, по-прежнему, остается единственным реальным подходом. При этом все еще открыты многие вопросы, касающиеся четкого понимания механизмов развития ишемически-реперфузионных повреждений, в том числе тех особенностей, которые обусловлены собственно длительным нахождением биообъектов при околонулевых температурах. Основной причиной этих вопросов служат выявленные

эмпирическим путем расхождения с общепринятой концепцией, утверждающей, что метаболические процессы при гипотермии практически полностью останавливаются. Достаточное количество экспериментальных данных, полученных в нашей лаборатории, позволяет утверждать, что холодовая ишемия, даже непродолжительная, приводит к значительным метаболическим нарушениям в изолированном органе, многие из которых уже не усугубляются при возвращении к нормотермии. В связи с этим, существующее стереотипное восприятие факторов повреждения, как ишемически-реперфузионного комплекса, в котором основным по силе повреждающего действия считается этап реоксигенации, а стадия хранения – неизбежное, но меньшее «зло», является одной из причин невозможности создания объективной интегральной картины происходящих событий. Все эти факторы определяют актуальность и необходимость дальнейших исследований в области холодового хранения изолированных органов.

Литература

1. Бакеева Л.Е., Барсков И.В., Егоров М.В. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии как средство, прерывающее программу старения. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга) // Биохимия. – 2008. – Т. 73, №12. – С. 1607–1621.
2. Белоус А.М., Лемешко В.В., Ясайтис А.А. Галидор, 1-бензил-1-(3'-диметиламинопропокси) циклогептанфумарат как разобщитель и ингибитор дыхательной цепи // Биохимия. – 1976. – Т. 41, №5. – С. 881–885.
3. Горрен А.К.Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота // Биохимия. – 1998. – Т. 63, №7. – С. 870–880.
4. Петренко О.Ю., Сосімчик І.О., Черкашина Д.В. та ін. Вплив мітохондріального антиоксиданту 10-(6-пластохіноніл) децилтрифенілфосфонію на інтенсивність пероксидних процесів та дихальну активність ізольованої печінки щурів після гіпотермічного зберігання // Укр. біохім. журнал. – 2009. – Т. 81, №6. – С. 43–48.
5. Петренко О.Ю., Черкашина Д.В., Сомов О.Ю. та ін. Експериментальне обгрунтування застосування консервуючих розчинів при трансплантації печінки // Трансплантологія. – 2004. – Т. 7, №4. – С. 167–169.
6. Семенченко О.А., Петренко А.Ю., Кравченко Л.П. и др. Сахарозо–содержащий раствор для гипотермического хранения органов // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, №1. – С. 253–255.
7. Семенченко О.А., Петренко А.Ю., Сукач А.Н. и др. Гипотермическое хранение клеток и тканей эмбрионов человека // Проблемы криобиологии. – 2001. – №2. – С. 80–84.
8. Скулачёв В.П. Попытка биохимиков атаковать проблему старения: “Мегапроект” по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы // Биохимия. – 2007. – Т. 72, №12. – С. 1700–1714.

9. Сосимчик И.А., Черкашина Д.В., Сомов А.Ю., Петренко А.Ю. Дыхательная активность и прооксидантно-антиоксидантный баланс печени крыс после гипотермического хранения в присутствии бенциклана фумарата // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 255–265.
10. Черкашина Д.В., Сосимчик И.А., Семенченко О.А. и др. Внесение биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток в консервирующий раствор улучшает функциональные показатели печени для трансплантации // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – №1–2 (50–51). – С. 270–273.
11. Черкашина Д.В., Сосимчик И.А., Семенченко О.А. и др. Производное пластохинона SkQ_1, адресованное в митохондрии, снижает ишемически-реперфузионные повреждения печени при гипотермическом хранении для трансплантации // Биохимия. – 2011. – Т. 76, №9. – С. 1254–1263.
12. Черкашина Д.В.,Ткачева Е.Н., Сомов А.Ю. и др. Перспективы применения биорегуляторов стволовых клеток при трансплантации печени // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 389–392.
13. Черкашина Д.В., Ткачова О.М., Сомов О.Ю. та ін. Вплив 2,4-динітрофенолу на дихальну активність та вміст АТР у печінці щурів після гіпотермічного зберігання та наступної реперфузії // Укр. біохім. журнал. – 2008. – Т. 80, №2. – С. 55–59.
14. Черкашина Д.В., Ткачова О.М., Сомов О.Ю. та ін. Прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці щурів після холодової ішемії в присутності 2,4-динітрофенолу та наступної реперфузії // Доповіді НАН України. – 2007. – №10. – С.168–173.
15. Пат. 38844 Україна, МПК A 01 N 1/02. Середовище «Гіполід» для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.Ю. Петренко, О.А. Семенченко, Д.В. Черкашина та ін.; заявник та власник патенту Харків, ІПКіК НАН України. – №U200808655; заявл. 01.07.08; опубл. 26.01.09, Бюл. №2.
16. Пат. 57680 А Україна, МПК A 01 N 1/02. Середовище для гіпотермічного зберігання ізольованої печінки / О.А. Семенченко, І.В. Шаніна, О.Ю. Петренко; заявник та власник патенту Харків, ІПКіК НАН України. – №118762; заявл. 05.11.02; опубл. 16.06.03, Бюл. №6.
17. Ambiru S., Uryuhara K., Talpe S. et al. Improved survival of orthotopic liver allograft in swine by addition of trophic factors to University of Wisconsin solution // Transplantation. – 2004. – Vol. 77, №2. – P. 302–319.
18. Arii S., Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. – 2000. – Vol. 7, №1. – P. 40–48.
19. Bailey S.M., Reinke L.A. Effect of flow ischemia-reperfusion injury on liver function // Life Science. – 2000. – Vol. 66, №11. – P. 1033–1044.
20. Barut I., Tarhan O. R., Kapucuoglu N. et al. Effect of bencyclane fumarate on intestinal ischemia reperfusion injury // ANZ J. Surgery. – 2008. – Vol. 78, №6. – P. 476–481.
21. Ben Abdennebi H., Elrassi Z., Scoazec J.Y. et al. Evaluation of IGL-1 preservation solution using an orthotopic liver transplantation model // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12, №33. – P. 5326–5330.
22. Ben Abdennebi H., Zaouali M.A., Alfany-Fernandez I. et al. How to protect liver graft with nitric oxide // World J. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 17, №24. – P. 2879–2889.
23. Ben-Ari Z., Hochhauser E., Burstein I. et al. Role of anti-tumor necrosis factor-alpha in ischemic-reperfusion injury in isolated rat liver in a blood free environment // Transplantation. – 2002. – Vol. 73, №12. – P. 1875–1880.
24. Bernardi P., Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection // Subcell. Biochem. – 2007. – Vol. 45. – P. 481–506.
25. Bock P.R. A contribution to the pharmacokinetics of bencyclane (Fludilat) in man // Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. – 1976. – Vol. 13, №4. – P. 246–252.
26. Bosetti F., Baracca A., Lenaz G., Solaini G. Increased state 4 mitochondrial respiration and swelling in early post–ischemic reperfusion of rat heart // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 563, №1–3. – P.161–164.

27. Bouma H.R., Ketelaar M.E., Yard B.A. et al. AMP-activated protein kinase as a target for preconditioning in transplantation medicine // Transplantation. – 2010. – Vol. 90, №4. – P. 353–358.
28. Cherkashina D.V., Semenchenko O.A, Grischuk V.P. et al. Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model // Cell Preservation Technology. – 2005. – Vol. 3, №3. – P. 203–212.
29. Cherkashina D.V.,Tkacheva E.N., Semenchenko O.A. et al. Pretreatment with fetal-specific factors positively affects rat liver metabolic activity after short-term cold storage // Cryobiology. – 2006. – Vol. 53, №3. – P. 435–436.
30. Cherkashina D.V., Tkacheva E.N., Somov A.Y. et al. Capacity of bioregulators of stem and progenitor cells to strongly affect liver redox-dependent processes // Rejuvenation Research. – 2011.– Vol. 14, №6. – P. 661–667.
31. Cohen M.V., Downey J.M. Ischemic postconditioning: from receptor to end-effector // Antioxid. Redox. Signal. – 2011. – Vol. 14, №5. – P. 821–831.
32. Collins G.M., Bravo-Shugarman M., Terasaki P.I. Kidney preservation for transplantation: initial perfusion and 30 hours ice storage // Lancet. – 1969. – Vol. 2, №7632. – P. 1219–1222.
33. Crestanello J.A., Doliba N.M., Babsky A.M. et al. Mitochondrial function during ischemic preconditioning // Surgery. – 2002. – Vol. 131, №2. – P. 172–178.
34. De Felice F.G., Ferreira S.T. Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus // IUBMB Life. – 2006. – Vol. 58, №4. – P. 185–191.
35. Du G., Mouithys-Mickalad A., Sluse F.E. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – Vol. 25, №9. – P. 1066–1074.
36. Duchen M.R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death // J. Physiol. – 2000. – Vol. 15, №529. – P. 57–68.
37. Dunne J.B., Davenport M., Williams R., Tredger J.M. Evidence that S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver // Transplantation. – 1994. – Vol. 57, №8. – P. 1161–1168.
38. Dutkowski P., Graf R., Clavien P.A. Rescue of the cold preserved rat liver by hypothermic oxygenated machine perfusion // Am. J. Transplant. – 2006. – Vol. 6, №5 (Pt. 1). – P. 903–912.
39. Esposito L.A., Kokoszka J.E., Waymire K.G. et al. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene // Free Rad. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, №5. – P. 754–766.
40. Fuller B.J., Lockett C.L., Proctor E., Busza A.L. Control of intracellular pH in mammalian liver at hypothermia: evidence for a relationship with energy metabolism // Cryobiology. – 1993. – Vol. 30, №6. – P. 543–550.
41. Fuller B.J., Shurey C., Lane N. et al. Hypothermic renal preservation with a sucrose/polyethylene glycol solution in a rabbit renal transplant model // CryoLetters. – 2006. – Vol. 27, №2. – P. 127–132.
42. Guibert E.E., Petrenko A.Y., Balaban C.L. et al. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade // Transfus. Med. Hemother. – 2011. – Vol. 38, №2. – P. 125–142.
43. Gupta M., Dobashi K., Greene E.L. et al. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion // Mol. Cell. Biochem. – 1997. – Vol. 176, №1–2. – P. 337–347.
44. Harding D., Fry C. Effect of temperature on calcium exchange in digitonin-treated rat ventricular myocytes // Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – Vol. 30, №847. – P. 136–139.
45. Hato S., Urakami A., Yamano T. et al. Attenuation of liver and lung injury after hepatic ischemia and reperfusion by a cytokine–supressive agent, FR167653 // Eur. Surg. Res. – 2001. – Vol. 33, №3. – P. 202–209.
46. Hines I.N., Kawachi S., Harada H. et al. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury // Mol. Cell Biochem. – 2002. – Vol. 234–235, №1–2. – P. 229–237.
47. Hirokawa F., Nakai T., Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation // Transplantation. – 2002. – Vol. 74, №6. – P. 779–783.

48. Howden B., Jablonski P. Liver preservation: a comparison of celsior to colloid-free University of Wisconsin solution // Transplantation. – 2000. – Vol. 70, №8. – P. 1140–1142.
49. Ioannou A., Dalle Lucca J., Tsokos G.C. Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage // Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 141, №1. – P. 3–14.
50. Isemer F.E., Ludwig A., Schunck O. et al. Kidney procurement with the HTK solution of Bretschneider // Transplant. Proc. – 1988. – Vol. 20, №5. – P. 885–886.
51. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2003. – Vol. 284, №1. – P. 15–26.
52. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences // J. Hepatol. – 1996. – Vol. 25, №5. – P. 774–780.
53. Jaeschke H., Mitchell J.R. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1989. – Vol. 160, №1. – P. 140–147.
54. Jamieson N., Lindell S., Sundberg R. et al. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver // Transplantation. – 1988. – Vol. 46, №4. – P. 512–516.
55. Katayama T., Yokoyama S., Mitomi T., Watanabe K. Alterations in glutathione peroxidase activity following reperfusion injury to rat liver // Tokai J. Exp. Clin. Med. – 1997. – Vol. 22, №2. – P. 33–44.
56. Ke B., Shen X.D., Lassman C.R. et al. Cytoprotective and antiapoptotic effects of IL-13 in hepatic cold ischemia/reperfusion injury are heme oxygenase–1 dependent // Am. J. Transplant. – 2003. – Vol. 3, №9. – P. 1076–1082.
57. Ke B., Shen X.D., Tsuchihashi S. et al. Viral interleukin-10 gene transfer prevents liver ischemia-reperfusion injury: Toll-like receptor-4 and heme oxygenase-1 signaling in innate and adaptive immunity // Hum. Gene Ther. – 2007. – Vol. 18, №4. – P. 355–366.
58. Kobayashi H., Kurokawa T., Kitahara S. et al. The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats // Transplantation. – 1992. – Vol. 54, №3. – P. 414–418.
59. Kobayashi S., Miescher E., Clemens M.G. A synergistic effect of extracellular hypocalcemic condition for hyperoxic reoxygenation injury in rat hepatocytes // Transplantation. – 1999. – Vol. 15, №67. – P. 451–457.
60. Lee C.Y., Mangino M.J. Preservation methods for kidney and liver // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, №3. – P. 105–112.
61. Lemasters J.J., Bond J.M., Chacon E. et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes // EXS. – 1996 – Vol. 76. – P. 99–114.
62. Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T. et al. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury // Mol. Cell Biochem. – 1997. – Vol. 174, №1–2. – P. 159–165.
63. Li L., Hsu A., Moore P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! // Pharmacol. Ther. – 2009. – Vol. 123, №3. – P. 386–400.
64. Liang R., Nickkholgh A., Kern M. et al. Green tea extract ameliorates reperfusion injury to rat livers after warm ischemia in a dose-dependent manner // Mol. Nutr. Food. Res. – 2011. – Vol. 55, №6. – P. 855–863.
65. Liu X., Zhu X.Z., Ji X.Q. Effect of basic fibroblast growth factor on focal ischemic injury and antioxidant enzyme activities // Zhongguo Yao Li Xue Bao. – 1999. – Vol. 20, №3. – P. 227–231.
66. McAnulty J.F., Reid T.W., Waller K.R., Murphy C.J. Successful six-day kidney preservation using trophic factor supplemented media and simple cold storage // Am. J. Transplant. – 2002. – Vol. 2, №8. – P. 712–718.
67. Minor T., Manekeller S. Assessment of hepatic integrity after ischemic preservation by isolated perfusion in vitro: the role of albumin // Cryobiology. – 2007. – Vol. 54, №2. – P. 188–195.
68. Mylotte L.A., Duffy A.M., Murphy M. et al. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, №5. – P. 1325–1336.
69. Nakao A., Choi A.M., Murase N. Protective effect of carbon monoxide in transplantation // J. Cell. Mol. Med. – 2006. – Vol. 10, №3. – P. 650–671.

70. Nicholson C.K., Calvert J.W. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury // Pharmacol. Res. – 2010. – Vol. 62, №4. – P. 289–297.
71. Oda K., Ikehara Y. Cytotoxicity of tris: it's effect on the secretory pathway // Seikagaku. – 1989. – Vol. 61, №4. – P. 290–294.
72. Ohkohchi N., Sakurada M., Koyamada M. et al. The importance of prevention of sinusoidal endothelial cell injury during cold preservation of liver graft // Tohoku J. Exp. Med. – 1994. – Vol. 174, №4. – P. 317–331.
73. Opelz G., Dohler B. Multicenter analysis of kidney preservation // Transplantation. – 2007. – Vol. 83, №3. – P. 247–253.
74. Parekkadan B., van Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure // PLoS ONE. – 2007. – Vol. 2, №9. – P. e941.
75. Pedotti P., Cardillo M., Rigotti P. et al. A comparative prospective study of two available solutions for kidney and liver preservation // Transplantation. – 2004. – Vol. 77, №10. – P. 1540–1545.
76. Peng J., Jones G.L., Watson K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements // Free Rad. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28, №11. – P.1598–1606.
77. Petrenko A.Y., Cherkashina D.V., Somov A.Y. et al. Reversible mitochondrial uncoupling in the cold phase during liver preservation/reperfusion reduces oxidative injury in the rat model // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, №3. – P. 293–300.
78. Ploeg R.J., Goossens D., Vreugdenhil P. et al. Successful 72-hour cold storage kidney preservation with UW solution // Transplant. Proc. – 1988. – Vol. 20, №1 (Suppl. 1). – P. 935–938.
79. Plotnikov E.Y., Kazachenko A.V., Vyssokikh M.Y. et al. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney // Kidney Int. – 2007. – Vol. 72, №12. – P. 1493–1502.
80. Quintana A.B., Guibert E.E., Rodriguez J.V. Effect of cold preservation/reperfusion on glycogen content of liver. Concise review // Ann. Hepatol. – 2005. – Vol. 4, №1. – P. 25–31.
81. Rauen U., Elling B., Gizewski E.R. et al. Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – Vol. 22, №1–2. – P. 17–24.
82. Rhee J.E., Jung S.E., Shin S.D. et al. The effects of antioxidants and nitric oxide modulators on hepatic ischemic–reperfusion injury in rats // J. Korean Med. Sci. – 2002. – Vol. 17, №4. – P. 502–506.
83. Rolo A.P., Teodoro J.S., Peralta C. et al. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATPsynthase and mitochondrial permeability transition // Transpl. Int. – 2009. – Vol. 22, №11. – P. 1081–1090.
84. Saiki S., Yamaguchi K., Chijiiwa K. Phosphoenolpyruvate prevents the decline in hepatic ATP and energy charge after ischemia and reperfusion injury in rats // J.Surg.Res. – 1997. – Vol. 73, №1. – P. 59–65.
85. Sakakura Y., Kaibori M., Oda M. Recombinant human hepatocyte growth factor protects the liver against hepatic ischemia and reperfusion injury in rats // J. Surg. Res. – 2000. – Vol. 92, №2. – P. 261–266.
86. Sato M., Sasaki M., Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – Vol. 316, №2. – P. 738–744.
87. Serteser M., Koken T., Kahraman A. et al. Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice // Jour. Surg. Res. – 2002. – Vol. 107, №2. – P. 234–240.
88. Shanina I.V., Kravchenko L.P., Fuller B.J., Grischenko V.I. A comparison of a sucrose-based solution with other preservation media for cold storage of isolated hepatocytes // Cryobiology. – 2000. – Vol. 41, №4. – P. 315–318.
89. Shibuya H., Ohkohchi N., Seya K., Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation // Hepatology. – 1997. – Vol. 25, №2. – P. 356–360.
90. Singh I., Gulati S., Orak J.K. et al. Expression of anyioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury // Mol. Cell Biochem. – 1993. – Vol. 125, №2. – P. 97–104.

91. Skulachev V.P. Functions of mitochondria: from intracellular power stations to mediators of a senescence program // Cell. Mol. Life Sci. – 2009. – Vol. 66, №11–12. – P. 1785–1793.
92. Skulachev V.P. Lowering of intracellular O_2 concentration as a special function of respiratory systems of cells // Biochemistry. – 1994. – Vol. 59, №12 – P. 1433–1434.
93. Snoeijs M.G., Vink H., Voesten N. et al. Acute ischemic injury to the renal microvasculature in human kidney transplantation // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2010. – Vol. 299, №5. – P. F1134–1140.
94. So P.W., Fuller B.J. Enhanced energy metabolism during cold hypoxic organ preservation: studies on rat liver after pyruvate supplementation // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, №3. – P. 295–300.
95. Solaini G., Harris D.A. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion // Biochem. J. – 2005. – Vol. 390 (Pt. 2). – P. 377–394.
96. Somov A.Y., Semenchenko O.A., Green C.J. et al. Mitochondrial function after liver preservation in high or low ionic strength solutions: a comparison between UW-based and sucrose-based (SBS) solution // CryoLetters. – 2009. – Vol. 30, №1. – P. 1–12.
97. Stegemann J., Minor T. Energy charge restoration, mitochondrial protection and reversal of preservation induced liver injury by hypothermic oxygenation prior to reperfusion // Cryobiology. – 2009. – Vol. 58, №3. – P. 331–336.
98. St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J. et al. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, №47. – P. 44784–44790.
99. Sun J., Trumpower B.L. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol. 419, №2. – P. 198–206.
100. Takeda Y., Arii S., Kaido T. et al. Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor // Transplantation. – 1999. – Vol. 67, №6. – P. 820–828.
101. Thatte H.S., Rousou L., Hussaini B.E. et al. Development and evaluation of a novel solution, Somah, for the procurement and preservation of beating and non-beating donor hearts for transplantation // Circulation. – 2009. – Vol. 120, №17. – P. 1704–1713.
102. Tsuchihashi S., Tamaki T., Tanaka M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate provides protection against hypothermic preservation and transplantation injury in the rat liver: the role of heme oxygenase–1 // Surgery. – 2003. – Vol. 133, №35. – P. 556–567.
103. Tuuminen R., Syrjala S., Krebs R. et al. Donor simvastatin treatment abolishes rat cardiac allograft ischemia/reperfusion injury and chronic rejection through microvascular protection // Circulation. – 2011. – Vol. 124, №10. – P.1138–1150.
104. Vairetti M., Griffini P., Pietrocola G. et al. Cold–induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione // Free Rad. Biol. Med. – 2001. – Vol. 31, №8. – P. 954–961.
105. Vendelin M., Eimre M., Seppet E. et al. Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle // Mol. Cell. Biochem. 2004. – Vol. 256–257, №1–2. – P. 229–241.
106. Vreugdenhil P.K., Rankin M.A., Southard J.H. Cold storage sensitizes hepatocytes to oxidative stress injury // Transpl. Int. – 1997. – Vol. 10, №5. – P.379–385.
107. Waller K.R., Foley J.D., McAnulty J., Murphy C.J. Trophic factor supplementation protects kidney tubule cells from cold ischemic injury and decreases free radical production during rewarming // Cell Preservation Technology. – Vol. 5, №3. – P. 132–136.
108. Wei L., Hata K., Doorschodt B.M. et al. Experimental small bowel preservation using Polysol: a new alternative to University of Wisconsin solution, Celsior and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution? // World J. Gastroenterol. – 2007. – Vol. 13, №27. – P. 3684–3691.
109. Yetgin T., Manintveld O.C., Duncker D.J., van der Giessen W.J. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury: ready for wide application in patients? // Neth. Heart. J. – 2010. – Vol. 18, №7–8. – P. 389–392.
110. Yuan X., Theruvath A.J., Ge X. et al. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives // Transpl. Int. – 2010. – Vol. 23, №6. – P. 561–570.
111. Zheng J.H., Min Z.L., Li Y.L. et al. A modified CZ–1 preserving solution for organ transplantation: comparative study with UW preserving solution // Chin. Med. J. (Engl). – 2008. – Vol. 121, №10. – P. 904–909.

Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития

В.В. Чижевский, О.С. Прокопюк, М.И. Грошевой, О.В. Липина, В.Ю. Прокопюк*

Отдел «Низкотемпературный банк биологических объектов»
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: prokopyuk@mail.ru*

Экологические катастрофы, увеличение числа наследственных заболеваний, исчезновение некоторых видов животных и растений – это далеко не полный перечень причин, которые способствуют стремительному развитию системы низкотемпературных банков (НТБ) во всём мире.

Для эффективного функционирования низкотемпературного банка биологических объектов (НТБ БО) необходимы соответствующие структуры, которые обеспечивают информационные, научные и инженерно-технические этапы его работы. Неотъемлемой частью деятельности НТБ являются, прежде всего, научные разработки, которые позволяют сохранить биологические объекты от повреждающего действия низких температур при их долгосрочном хранении.

Зарубежный опыт деятельности низкотемпературных и тканевых банков интересен, но для его внедрения в практику необходимы значительные финансовые средства. Поэтому создание научной

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 469–486.
© В.В. Чижевский, О.С. Прокопюк, М.И. Грошевой и др., 2012

основы методической работы НТБ в условиях нашей страны является весьма актуальным.

Используемые сокращения
МДТ – максимально допустимая температура
НТБ – низкотемпературный банк
НТБ БО – низкотемпературный банк биологических объектов
ХБ-0,5 – хранилище биопродуктов

В настоящее время отдел «Низкотемпературный банк биологических объектов» Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины по уровню инженерно-технической оснащенности, фундаментальным и экспериментальным исследованиям занимает ведущее место среди структур аналогичного профиля. По распоряжению Кабинета Министров Украины в 2002 году Низкотемпературный банк биологических объектов нашего института был внесен в реестр объектов, которые составляют национальное достояние страны.

В 2012 году исполняется 10 лет работы НТБ БО в качестве объекта национального достояния. Сотрудники отдела за истекший период опубликовали 90 научных статей (из них 9 в зарубежных изданиях); получили 29 патентов на изобретения и полезные модели; материалы научных исследований нашли отражение в 3 монографиях; составлено 3 методических рекомендаций. По результатам работы сотрудников отдела было представлено более 30 докладов на отечественных и международных научных форумах.

Накопленный в НТБ БО опыт научно-исследовательской работы, глубина используемых методологических подходов позволили разработать современные криотехнологии для внедрения в работу криобанков различной специализации (банки растительных объектов, аутобанки кордовой крови, плаценты и др.).

Институт заключил договоры о сотрудничестве для проведения совместной научно-исследовательской работы на базе НТБ БО с ведущими научными и высшими учебными заведениями Украины, а также исследовательскими институтами России.

В рамках научной работы, которая планируется и выполняется в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, большое внимание уделяется тесному сотрудничеству НТБ БО и других научных подразделений.

Сегодня в НТБ БО института хранятся биологические образцы различного вида и уровня организации: фракции крови, ткани и суспензии клеток животного происхождения, генетические ресурсы растительного, ксено- и аллогенного происхождения, микроорганизмы и др.

Основными направлениями деятельности низкотемпературного банка являются разработка технологий криоконсервирования; низкотемпературное хранение биологических объектов; оценка состояния сохранности биоматериала.

В представленной работе детально рассмотрены научные подходы и инженерно-техническое обеспечение низкотемпературного хранения биологических объектов в условиях НТБ.

Геометрия температурного поля криогенного хранилища и оптимизация условий хранения биоматериалов

Важнейшей задачей работы НТБ является обеспечение максимальной сохранности биологического материала. В настоящее время в литературе, посвящённой вопросам криобиологии, существует большое количество сведений о консервировании различных биологических объектов, режимах замораживания, криозащитных средах, однако при этом недостаточно данных о сохранности биообъектов, которые длительное время находятся при температуре жидкого азота. Научные исследования в этой области позволяют создавать коллекции разнообразных криоконсервированных биологических материалов разного уровня организации: от растений и бактерий до клеток и тканей теплокровных организмов [1–4].

С целью поиска оптимальных условий хранения мы провели экспериментальные исследования. В частности, была определена критически допустимая температура для биологических объектов эмбрионального происхождения, а также некоторых штаммов микроорганизмов, которые долгосрочно хранятся в низкотемпературном банке. Такой пороговой величиной является температура –130°С. Неоднократные колебания температуры выше этого значения могут приводить к снижению жизнеспособности криоконсервированного биологического материала [5].

Для долгосрочного низкотемпературного хранения биообъектов важно понимать, как распределяются температурные поля в се-

редине объема криогенных хранилищ, а также учитывать влияние на тепловые процессы колебаний уровня жидкого азота вследствие естественного испарения и выполнения технологических операций. В связи с этим мы исследовали распределение температуры в объеме криогенного хранилища ХБ-0,5 (Свердловский завод кислородного машиностроения) в зависимости от уровня его заполнения жидким азотом [9].

Серии измерений температуры проводили над зеркалом жидкого азота (шаг 5 см) в криогенном хранилище при разном уровне заливки жидкого азота. Уровень азота в криохранилище увеличивали на 5 см после каждой серии измерений, начиная с 10 и заканчивая 70 см.

После математической обработки экспериментальных данных мы имели возможность отобразить в числовом и графическом виде изменения температурного поля в середине объёма криохранилища в зависимости от его заполнения хладогентом. Полученные результаты обрабатывали с помощью математического пакета MathCAD 11. Приближения проводили отрезками полиномов второй степени только для точек, которые находились над поверхностью жидкого азота.

В результате была создана матрица, которая содержала значения температур в точках с интервалом 1 см по высоте над зеркалом жидкого азота и уровню заливки. На её основе была построена трехмерная графическая модель, отражающая геометрию температурного поля криохранилища (рис. 1).

Также были получены семейства кривых температуры в конкретной точке внутреннего объема хранилища в зависимости от его заполнения жидким азотом и кривые, которые отображают изменения темпера-

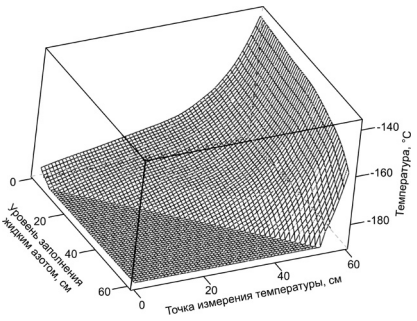


Рис. 1. Распределение температурного поля в криохранилище ХБ-05.

туры по высоте при конкретном уровне заливки (рис. 2, 3).

Установлено, что при минимальном уровне жидкого азота (5–10 см) температура в наиболее «теплой» точке (зона горловины хранилища) не поднимается выше –100°С. В процессе повышения уровня жидкого азота в хранилище температура снижалась, и в зоне горловины при уровне заливки азота 65 см достигала –140°С.

Полученная нами трехмерная графическая модель позволяет:

– рассчитывать конфигурацию температурного поля во всем объеме криогенного сосуда по значению температуры в конкретной точке низкотемпературного хранилища;

– определять температуру в любой точке низкотемпературного хранилища и уровень заполнения криососуда жидким азотом;

– фиксировать температурные зоны, опасные для сохранности биообъектов, в зависимости от уровня заполнения криохранилища жидким азотом [6].

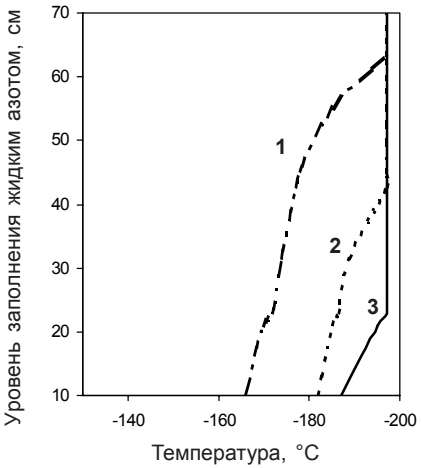


Рис. 3. Кривые температуры для уровня азота: 1 – 28 см; 2 – 48 см; 3 – 58 см.

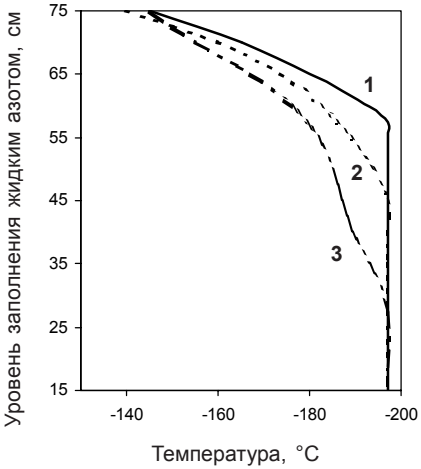


Рис. 2. Кривые температуры в точках на высоте: 1 – 22 см; 2 – 42 см; 3 – 62 см.

Исследование условий долгосрочного хранения биологических образцов в парах жидкого азота

При длительном хранении биологического материала в низкотемпературном банке возникают определённые методологические проблемы.

Значительная часть криоконсервированного биоматериала находится в пластиковых криопробирках. Внутрь некоторых образцов вследствие недостаточной герметизации криогенной тары может попадать жидкий азот, что приводит к крайне нежелательным перепадам давления в криопробирках при проведении технологических операций: азот из жидкого состояния переходит в газообразное. Резкое испарение азота может разрушительно воздействовать на биологический материал, а также приводить к выбросу микрочастиц содержимого криопробирок. В результате возникает риск контаминации образцов биоматериала в криопробирках через среду жидкого азота. При этом некоторые микроорганизмы и вирусы выдерживают воздействие низких температур, сохраняя при этом свою структуру и функции. Таким образом, жидкий азот может быть потенциальным источником опасности инфицирования биологических объектов, которые долгосрочно хранятся в НТБ БО.

На наш взгляд, решением указанных проблем является хранение биологических образцов в парах жидкого азота. Однако при использовании паровых хранилищ также возникают некоторые трудности. Во-первых, при небольшом количестве в паровом хранилище жидкого азота колебания его уровня вследствие естественного испарения влияют на температурное поле хранилища намного сильнее, чем в хранилище, полностью заполненном жидким азотом. Во-вторых, энергоемкость и теплопроводность парового хранилища значительно меньше, поэтому инерционность тепловых процессов в нем может приводить к опасному повышению температуры биологических образцов во время проведения технологических операций. Таким образом, при работе в паровом хранилище необходимо строго придерживаться ограничений (длительность проведения технологических операций внутри низкотемпературного хранилища, количество загружаемого материала и т. д.).

Перечисленные факты обусловили необходимость исследований по определению влияния тепла, поступающего в процессе текущих работ с биообразцами, на температурное поле в середине объема хранилища при малых уровнях заполнения его жидким азотом.

Целью нашей работы было исследование возможности использования хранилища ХБ-0,5 в качестве парового, а также разработка методических рекомендаций по хранению и проведению технологических операций с биопрепаратами (закладка, извлечение, сортировка и т.п.), которые хранятся в парах жидкого азота.

Для упорядоченного размещения биологических образцов, которые находятся в контейнерах, используют различное укладочное оборудование. В криогенных хранилищах ХБ-0,5 размещают укладки в виде цилиндрических стаканов из нержавеющей стали диаметром 115 мм и высотой 400 мм, в которых находятся 8 цилиндрических канистр из нержавеющей стали диаметром 43 мм и высотой 190 мм. В канистры помещают контейнеры с биообъектами. Все укладочное оборудование должно иметь маркировку, соответствующую нумерации и обозначению данного хранилища. В хранилище ХБ-0,5 может максимально разместиться 45 стаканов и 360 канистр.

Для хранения большого количества криоампул объемом 1–2 мл используют укладки – прямоугольные стаканы из алюминия или нержавеющей стали с перегородками 230×230 мм и высотой 500 мм, в которых размещаются 9 прямоугольных кассет, изготовленных из этого же материала. В кассеты укладывают ампулы с биоматериалом. Требования к их маркировке такие же, как и к круглым стаканам. В хранилище ХБ-0,5 максимально может быть размещено 18 стаканов и соответственно 162 кассеты.

В эксперименте использовали пластиковые криоампулы («Nalge Nunc», США), заполненные средой для замораживания: 2,0 и 0,5 мл. Контрольную ампулу со средой, в которой находится термодатчик для измерения температуры, помещали в стандартный прямоугольный стакан вместе с другими ампулами.

На предварительном этапе работы с целью определения стационарного температурного поля в объёме парового хранилища мы исследовали распределение температуры в хранилище биопродуктов ХБ-0,5 при уровне жидкого азота 10 см (рис. 4).

Экспериментальные данные свидетельствуют, что в стационарном состоянии хранилища температура в зависимости от высоты хранения изменяется с -130 до -190 °С. В наиболее «теплой» точке (зона горловины хранилища) температура не поднимается выше –120°С, а на максимальной высоте, где хранятся биопрепараты, – выше –170°С (рис. 5).

Основываясь на полученных результатах, мы определяли критически допустимую температуру для биологического материала, который продолжительно хранится при низких температурах. Поэтому для гарантированного полноценного сохранения биологического материала была установлена максимально допустимая температура (МДТ) безопасного хранения биообъектов (–150°С).

Таким образом, теоретически и практически можно создать паровое низкотемпературное хранилище на базе ХБ-0,5 с использованием паров жидкого азота.

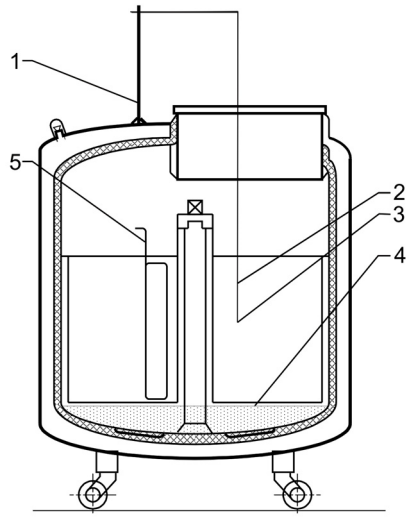


Рис. 4. Схема экспериментальной установки: 1 – штатив; 2 – измерительная рейка; 3 – термометр сопротивления; 4 – зеркало азота; 5 – стакан.

Основной технологической операцией при хранении биоматериалов в НТБ БО является извлечение/закладка образцов, при которой может значительно колебаться температура внутри парового хранилища что, в свою очередь, влияет на сохранность биоматериала. Другие операции (осмотр, сортировка образцов и т. д.) выполняют в среде жидкого азота, поэтому главное внимание при использовании парового хранилища следует уделять процедурам извлечения/закладки и размещения биообразцов.

На следующих этапах работы изучали влияние тепла,

которое поступает при выполнении текущих технологических операций, на температурное поле внутри объёма парового хранилища. Для этого была смоделирована критическая ситуация: стандартный прямоугольный стакан с образцами на 1 мин вынимался из хранилища (минимальное время для извлечения/закладки образца составляет 10–15 с). При этом ампула с термодатчиком была размещена в верхней кассете стакана на высоте 60 см от дна хранилища.

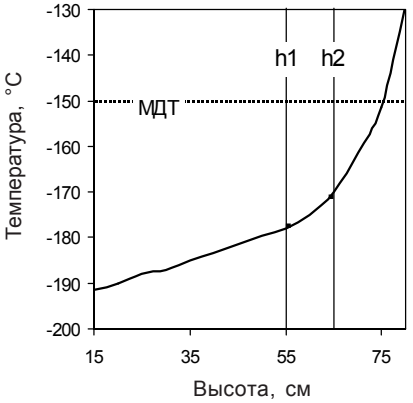


Рис. 5. Вертикальное распределение температур в паровом хранилище при уровне заполнения азотом 10 см: h1 – высота круглого стакана; h2 – высота прямоугольного стакана.

В результате исследований установлено, что при одноразовом извлечении стакана на 1 мин температура в ампуле не достигала критически допустимой, даже в верхнем ярусе стакана. Значения температуры в ампуле изменялись в три этапа: отогрев – повышение температуры; восстановление – быстрое понижение температуры; стабилизация – температура изменяется сравнительно медленно и полностью восстанавливается через 8–12 ч (рис. 6).

Если стандартная прямоугольная укладка с биопробами однократно извлекалась (на 15 с) из парового хранилища, то температура в стакане повышалась на 2,5–3,5 градусов на высоте хранения 60 см (рис. 7).

При извлечении биоматериала из нескольких кассет один и тот же стакан извлекают через каждые 30–60 с. На следующем этапе мы моделировали технологическую ситуацию закладки/извлечения материала и определяли допустимое количество её повторов. Стандартная укладка для биологического материала, как правило, состоит из 9 ярусов-кассет.

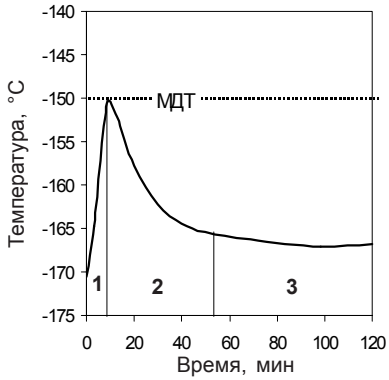


Рис. 6. Изменение температуры в ампуле при извлечении стакана на 1 мин: 1 – этап отогрева; 2 – этап восстановления температуры; 3 – этап стабилизации температуры.

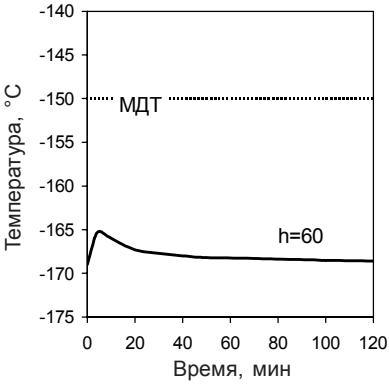


Рис. 7. Изменение температуры в контрольной ампуле после одного подъема стакана на 15 с.

Установлено, что после 9 подъемов стакана (время каждого подъёма – 15 с) температура на уровне верхнего яруса хранения не поднималась выше –150°С и оставалась в пределах МДТ. Таким образом, при извлечении в процессе технологических операций всех кассет температура не достигала критических значений, которые могли бы привести к повреждению биологических образцов (рис. 8).

В следующей серии экспериментов мы определяли температуру на нижнем ярусе стандартного прямоугольного стакана (25 см от дна хранилища). По данным на рис. 9 можно определить, что от высоты хранения биообразцов в стакане зависят температура после отогрева и скорость её восстановления в контрольной ампуле. Проведенные исследования показали, что после 9 подъемов стакана на 15 с в нижнем его ярусе (h = 25 см) температура поднимается в меньшей степени, а восстанавливается быстрее, чем на высоте верхнего (h = 60 см).

Следует отметить, что после 9 подъемов стакана на 15 с температурные процессы (скорость восстановления температуры в контрольной ампуле, влияние тепла на соседние укладки) сходны

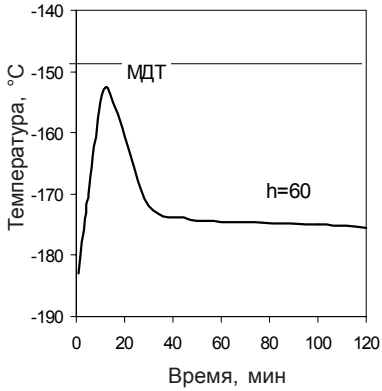


Рис. 8. Изменение температуры в контрольной ампуле после 9 подъемов стакана на 15 с.

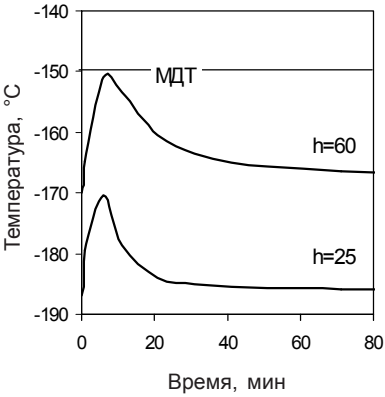


Рис. 9. Изменение температуры в контрольной ампуле в зависимости от высоты хранения после 9 подъемов стакана на 15 с.

и аналогичны тем, которые происходят при закладке/извлечении стакана на 1 мин (см. рис. 6).

В низкотемпературном хранилище ХБ-0,5 могут размещаться от 18 до 40 стандартных укладок (стаканов) разной конфигурации. На предыдущих этапах исследований мы оценивали изменения температуры на разной высоте хранения в стандартных стаканах, которые извлекали из криохранилища на 15 с и 1 мин, а затем опять переносили в пары жидкого азота. При такой технологической операции за счет дополнительно поступающего тепла температура перераспределяется во всем объеме хранилища. Поэтому необходимо было оценить степень изменения температуры в соседних стаканах, которые не извлекались из парового хранилища. Мы исследовали изменение температуры в неподвижном стакане после извлечения/закладки стандартного оборудования (рис. 10).

Установлено, что тепло, которое было внесено стаканом, через 45–60 мин распределяется по всему объему хранилища, но средняя температура в низкотемпературном хранилище поднимается на 3–5°С на верхнем уровне соседнего стакана (h = 60 см) и на 1°С – на нижнем (h = 25 см).

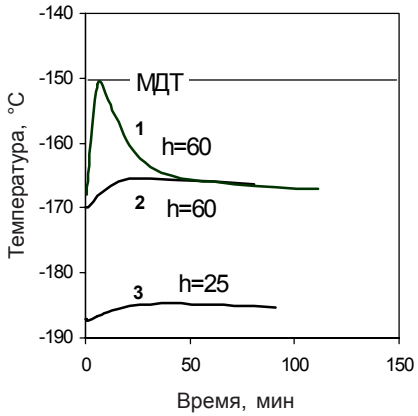


Рис. 10. Влияние привнесенного тепла на температуру в стакане: кривая 1 – в подвижном; кривые 2, 3 – неподвижном.

Биообразцы, которые хранятся в криогенных хранилищах во время проведения технологических работ в низкотемпературном банке, извлекают достаточно часто. Поэтому было важно определить влияние тепла при последовательном извлечении/закладке нескольких стаканов на температуру контрольной ампулы, которая находится в неподвижном стакане на верхнем ярусе хранения (h = 60 см). В ходе эксперимента сигналом для повторного извлечения/закладки прямоугольного стакана в хранилище являлось окончание отогрева ампулы после закладки предыдущего стакана. Следует отметить, что укладки извлекались на 1 мин (рис. 11).

Полученные данные свидетельствуют о том, что после двух последовательных извлечений/закладок стаканов, которые вынимались на 1 мин, температура в соседнем стакане (h = 60 см) повышалась на 7–8°С.

Измерение температуры на уровне верхнего яруса хранения биообразцов позволило нам оценить максимально возможные изменения температуры в полезном объеме криохранилища. Биологический материал, который размещен ниже, очевидно, имеет более благоприятные температурные условия для хранения. Биологические образцы, находящиеся в зоне, отдаленной от места проведения технологических операций, также испытывают меньшее влияние при повышении температуры вследствие извлечения/закладки стаканов. Поэтому, основываясь на полученных экспериментальных данных, можно гарантировать безопасность биообъек-

тов при проведении технологических работ во всем объеме хранения.

На основании результатов проведенной работы можно сделать следующие выводы:

– низкотемпературное хранилище биологических объектов ХБ-0,5 может использоваться в качестве парового (уровень заливки жидкого азота не менее 10 см);

– извлечение стандартной укладки из парового хранилища в среду с температурой 18–23°С на 1 мин приводит к повышению в ней температуры на 15–20°С в верхнем ярусе хранения (h = 60 см);

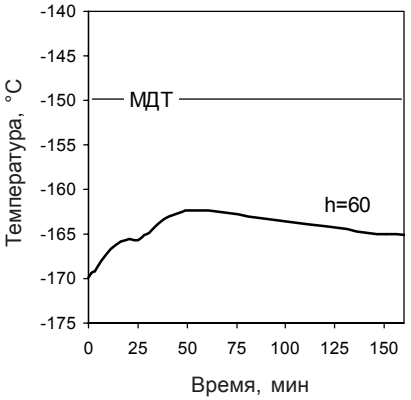


Рис. 11. Влияние привнесенного тепла от последовательного внесения двух стаканов, которые извлекались на 1 мин, на температуру в соседнем стакане.

– при однократном извлечении стандартной укладки из парового хранилища на 15 с в среду с температурой 18–23°С температура в стакане повышается на 3–5°С в верхнем ярусе хранения;

– продолжительность восстановления температуры в контрольной ампуле после перечисленных выше технологических операций составляет 45–60 мин для образцов, которые находятся на уровне верхнего яруса хранения (h = 60 см) и 25–30 мин – нижнего яруса (h = 25 см);

– при каждой технологической операции извлечения/закладки стандартного оборудования температура в паровом хранилище повышается на 3–5°С после подъема на 1 мин и 1,5–2°С при подъеме на 15 с.

Полученные результаты позволили нам разработать методические рекомендации по эксплуатации ХБ-0,5 как парового хранилища, а также регламентировать текущие технологические операции, связанные с хранением биологического материала в парах жидкого азота [7].

Температурные и временные ограничения при низкотемпературном хранении биологического материала в криопробирках

При хранении большого количества образцов в НТБ БО, а также проведении технологических операций с биоматериалом возможен нежелательный отогрев замороженных биообъектов, поэтому важно учитывать временные ограничения для технологических процедур хранения и работы с биологическими образцами.

Основная часть биологического материала НТБ БО хранится в пластиковых криоампулах объемом 1–2 мл («Nalge Nunc» или «Corning», США). Ампулы размещали в специальных кассетах и стаканах, которые хранятся в среде жидкого азота (рис. 12). Для исследования температурных процессов внутри криопробирок мы моделировали технологические операции по закладке/извлечению, сортировке биопрепаратов, которые находятся в пластиковых ампулах. Ампулы заполняли средой для замораживания объемом 0,5 и 2 мл. Температуру измеряли в центре ампулы и в её пристенной зоне.

В таблице приведены результаты исследований модели аварийной ситуации: ампулу со средой для замораживания охлаждали до –196°С, вынимали из криохранилища и отогревали при температуре 20°С.

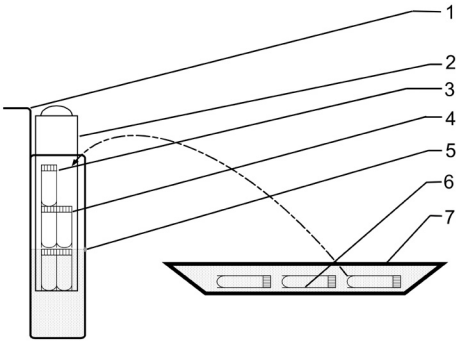


Рис. 12. Схема технологических операций, которые выполняются с биоматериалом: 1 – стакан; 2 – подвижная часть стакана; 3 – ампула с биоматериалом на высоте 5 см над поверхностью азота; 4 – ампула с биоматериалом непосредственно над поверхностью азота; 5 – отверстие для заливки азота; 6 – ампула для закладки в стакан; 7 – ванна с азотом, в которой находятся ампулы при сортировке.

Температура образцов биологического материала во время моделирования аварийной ситуации

Операции	Объем среды, мл	Время, мин	Температура, °С	Контроль температуры, °С	
				в центре	пристенно
Хранение в жидком азоте	2,0	–	-196	+	+
	0,5		-196	+	+
Перенос в окружающую среду с температурой 20°С	2,0	1	-156,6	+	
	2.0		-138,2		+
	0,5		-124,3	+	
	0,5		-113,2		+
	2,0	2	-118,2	+	
	2,0		-100,0		+
	0,5		-75,9	+	
	0,5		-65,2		+
	2,0	3	-83,6	+	
	2,0		-73,6		+
	0,5		-50,0	+	
	0,5		-43,2		+

На следующих этапах контрольную ампулу, заполненную средой для замораживания, размещали среди других образцов, температуру регистрировали в процессе выполнения стандартных технологических процедур.

В результате исследований можно сделать следующие выводы:

– при технологических операциях с биологическими препаратами, которые находятся в пластиковых криоампулах, температура внутренней среды не повышается выше –160°С;

– в процессе технологических операций разница температур в центральной и пристенных зонах пластиковой ампулы колеблется в пределах 1–10%;

– замороженный биоматериал в пластиковых ампулах объемом 0,5 мл должен находиться при температуре 18–20°С не более 2 мин, а объемом 2 мл – 3 мин;

– при уменьшении объема биологического материала в ампуле скорость отогрева биообразцов повышается, поэтому время работы с ампулами, в которых объем материала менее 200 мкл, должно быть минимальным.

Таким образом, нами был изучен характер температурных процессов при хранении биологических материалов в условиях низкотемпературного банка [8]. Разработана методика полноценного хранения биоматериалов в парах жидкого азота.

Перспективы и пути развития низкотемпературного банка биологических объектов

На современном этапе развития науки не существует другой альтернативы для сохранения генофонда планеты, кроме хранения генетических ресурсов в условиях низких температур. Существует необходимость создания мировой сети низкотемпературных банков разной специализации. Потребности современной медицины и биотехнологических производств также стимулируют развитие исследований в области криогенных технологий.

Главным принципом деятельности низкотемпературного банка нашего института является научное обоснование всех этапов работы по определению приоритетных и перспективных направлений научно-практической деятельности банка. Реализация этого принципа возможна при соблюдении мировых и государственных положений и норм биоэтики, тщательном отборе первичного материала, микробиологическом и вирусологическом контроле всех этапов работы, специализированном программном криоконсер-

вировании биоматериала, его надежном долгосрочном хранении, инженерно-техническом и информационно-программном обеспечении деятельности НТБ.

Мы проанализировали результаты работы НТБ в Украине, странах СНГ и зарубежья; «Общие стандарты для банков тканей» Европейской ассоциации тканевых банков; «Инструкцию по обеспечению качества и безопасности при работе с органами, тканями и клетками» Совета Европы; рекомендации и постановления о гармонизации работы тканевых банков стран-членов ЕС. На основе научно-теоретических и практических данных, а также соответствующего опыта Института проблем криобиологии и криомедицины были сформулированы и внедрены научные принципы деятельности НТБ БО:

1. Приоритетными в деятельности НТБ БО являются фундаментальные исследования в области криобиологии и криомедицины.

2. Основным методическим подходом НТБ БО института является ориентация на сохранность морфофункциональных характеристик криоконсервированных биологических объектов.

3. Компьютерно-информационное обеспечение всех этапов работы НТБ БО, текущая база данных банка, сотрудничество с другими подразделениями института.

4. Специализация НТБ БО – создание коллекций клеток, клеточных линий, тканей, органных культур, микроорганизмов, биологических соединений и композиционных биологических суспензий ауто-, алло- и ксеногенного происхождения разных сроков онтогенеза, растений (меристемы, семена) в качестве экспериментального материала, а также стратегических запасов для потребностей биологии, медицины, биофизики, аграрной науки и др.

5. Разработка и использование современного оборудования НТБ БО (замораживатели, холодильники, система контроля уровня газов и жидкого азота, система поддержания температуры в низкотемпературных хранилищах и др.).

6. Научное сотрудничество с ведущими научными школами и учреждениями соответствующего профиля Украины и зарубежья.

Литература

1. Грищенко В.І., Висеканцев І.П., Кудокоцева О.В. та інш. Обладнання низькотемпературного банку біологічних об'єктів та умови довгострокового зберігання біологічних об'єктів у низькотемпературному банку: Метод. рекомендації ІПКіК НАН України. – Х., 2004.– 14 с.
2. Прокопюк В.Ю., Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Чижевский В.В. Опыт работы низкотемпературного банка аутологичных и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине // Сб. тезисов Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». – М., 2010. – С. 58–59.
3. Прокопюк О.С., Грищенко В.И., Строна В.И., Юрченко Т.Н. Криоконсервированные биобъекты плацентарного происхождения в Украинском тканевом банке // Материалы 15-го Международного конгресса ЕАТБ. – Варна, 2006.– С. 27.
4. Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю. Криоконсервированные плацентарные биообъекты в тканевом аутобанке // Сб. тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». – СПб., 2010. – С. 24.
5. Чижевський В.В., Висеканцев І.П., Грошевой М.І. Оптимізація умов зберігання біологічного матеріалу в низькотемпературному банку // Сучасні аспекти репродуктології, перинатальної медицини та кріобіології. – 2003.– С. 242–247.
6. Чижевский В.В., Грошевой М.И., Прокопюк О.С., Беспалов А.А. Криогенное хранилище: геометрия температурного поля и оптимизация условий хранения биоматериалов // Цитология. – 2004. – Т. 46. – №9. – С. 881–882.
7. Чижевский В.В., Грошевой М.И., Прокопюк О.С., Беспалов А.А. Исследование особенностей использования парового низкотемпературного хранилища для долгосрочного хранения биологического материала // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №2. – С.132–134.
8. Пат. № 96041А Україна, МПК A01N1/02C. Спосіб роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів/ В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, О.В. Ліпіна; замовник і патентовласник ІПКіК НАНУ.–№20031110797; заявл. 28.112003; опубл. 16.08.04, Бюл. №8.
9. Пат. на полезную модель №21402 Украина, МПК G01F23/22, G01K13/00. Способ определения уровня криогенной жидкости/ М.И. Грошевой, А.Н. Федорович, В.В. Чижевский; заявитель и патентообладатель ИПКиК НАНУ.– №200610161; заявл. 22.09.06; опубл.15.03.07, Бюл. №3.

Аппаратурное обеспечение низкотемпературного консервирования биологических объектов, гипотермических воздействий, криотерапии и криохирургии

С.Ф. Дудкин*, В.А. Соколов, А.Н. Федорович

Специальное конструкторско-технологическое бюро
с опытным производством
Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Скорохода, 4, г. Харьков, Украина 61093
электронная почта: dsf-serg@mail.ru

В настоящее время одним из наиболее актуальных, перспективных и быстро развивающихся направлений применения холода в биологии и медицине является низкотемпературное консервирование биологических объектов с целью длительного их хранения без существенного нарушения структуры и функции. Целесообразность использования низких температур для решения этой задачи обусловлена тем, что скорость любого из процессов активационного типа, к которым относятся метаболические процессы и процессы структурного разрушения, резко падает с понижением температуры окружающей среды [1]. Однако для охлаждения биообъекта до температуры, при которой любые процессы практически останавливаются, необходимо преодолеть диапазон температур, при котором в охлаждаемом объекте изменяется агрегатное состояние, то есть возникают и растут кристаллы льда. Именно с образованием и ростом кристаллов льда прямо или

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 487–499.
© С.Ф. Дудкин, В.А. Соколов, А.Н. Федорович, 2012

косвенно связаны основные факторы, вызывающие повреждение клеточных структур при охлаждении клеточных суспензий и других биологических объектов до низких температур.

В соответствии с двухфакторной теорией криоповреждения P. Mazur [5] на выживаемость клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии оказывают влияние два типа явлений и связанных с ними повреждающих факторов. Первый тип криоповреждений обусловлен контактом клеток со средой, которая в силу значительно повышенных по сравнению с нормой осмотического давления и ионной силы, значительного сдвига pH (как правило, в кислую сторону) оказывает цитотоксическое действие. Оно усугубляется по мере увеличения времени экспозиции клеток в области температур от начала внеклеточной кристаллизации в клеточной суспензии до полного затвердевания криоконсервируемого образца. Очевидно, неблагоприятное действие этих так называемых «факторов раствора» можно уменьшить, увеличив скорость охлаждения клеточной суспензии на этапе кристаллизации и тем самым сократить время контакта клеток с цитотоксической кристаллизующейся средой. Второй тип повреждений клеток на этапе кристаллизации клеточной суспензии согласно двухфакторной теории криоповреждения вызван образованием кристаллов льда внутри клеток, что, как правило, гибельно для клеток. С точки зрения двухфакторной теории криоповреждения оптимальной является настолько низкая скорость, что вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда и повреждение этими кристаллами клеток становятся малыми, и в то же время настолько высокая, что время действия на клетки неблагоприятных факторов, обусловленных эффектами раствора, является недостаточно большим, чтобы вызвать необратимое повреждение клеток.

В настоящее время двухфакторная теория криоповреждения общепризнана, основные ее следствия имеют многократное экспериментальное подтверждение [2–4, 6]. В связи с этим подавляющее большинство исследований в области криобиологии направ-

лено на поиск оптимального режима охлаждения при замораживании биологических объектов.

Оптимальные режимы медленного охлаждения (примерно от 0,1 до 10 град/мин) реализуются с помощью программных замораживателей. Для отбора тепла от образцов часто используют холодные пары жидкого азота или его парожидкостную смесь, генерация которых контролируется нагреванием помещенного в сосуд Дьюара резистора. Температуру образца или температуру в камере замораживателя регулируют по принципу отрицательной обратной связи, сравнения ее с температурой (сигналом) задающего режим охлаждения устройства. Программные замораживатели используют для замораживания клеточных суспензий в контейнерах объемом до 1 л. При разных габаритах контейнеров их толщина обычно не превышает 1 см. Материалом для контейнеров могут быть различные полимерные материалы или металл (пищевой алюминий, нержавеющая сталь). Ниже приведен вариант блок-схемы программного замораживателя (рис. 1).

Обычно биообъекты охлаждают до температур не ниже –70°С, затем контейнеры с криоконсервируемым материалом погружают

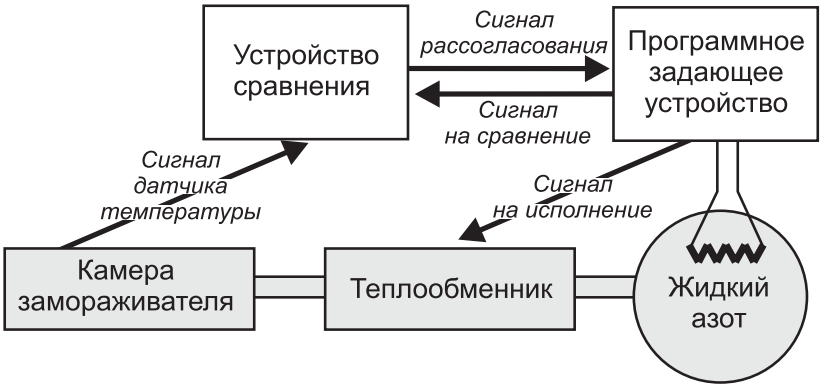


Рис.1. Блок-схема программного замораживателя.

в жидкий азот. Для транспортировки замороженного материала во избежание повышения температуры используют транспортные сосуды Дьюара.

Хранение замороженных биообъектов осуществляется в низкотемпературных банках, оснащенных оборудованием, предназначенным для замораживания, длительного хранения и оттаивания биологических объектов (программные замораживатели, широкогорлые сосуды Дьюара, размораживатели, системы сигнализации уровня жидкого азота в криохранилищах и автоматического долива жидкого азота из резервуара, размещенного вне помещения криобанка, набор транспортных сосудов Дьюара). Внутри криохранилищ расположены стойки, выдвижные боксы и ячейки, которые обеспечивают систематизацию и быстрый доступ к образцам.

Кроме низкотемпературного хранения биологических объектов холод применяется в биологии и медицине для гипотермических воздействий на организм, криотерапии и криохирургии.

Основная задача гипотермического воздействия на организм – повышение устойчивости тканей организма (в первую очередь мозга и сердца) к гипоксии путем снижения скорости биохимических реакций и потребления кислорода. Снижение температуры мозга при краниоцеребральной гипотермии до 28–26°С (снижение температуры тела до 32–30°С) сокращает потребность организма в кислороде примерно на 30%. Для этого используют специальные аппараты – гипотермы, состоящие из емкости с охлаждаемой жидкостью (хладоагентом), системы программируемой подачи хладоагента и шлема, через который он циркулирует. Риск осложнений при создании такого гипотермического состояния минимальный.

Локальная гипотермия предусматривает разные варианты охлаждения участка тела: прямой контакт с твердым, жидким или газообразным хладоносителем, применение систем с программируемой циркуляцией хладоносителя.

Криотерапия – уникальный метод, широко применяющийся в медицине, косметологии и др. При воздействии холода на небольшой участок тела с медицинской или косметологической целью

оказывается мощный общеоздоровительный эффект. Терапевтический эффект локальной криотерапии выражается в действии на поверхностные ткани, то есть на внешние рецепторы и микрососуды. В коже теплокровных защитный тепловой барьер представлен четырьмя уровнями сосудистых сплетений. Температурный градиент в коже достаточно высок. Снижение температуры до субдеструктивных значений возникает на глубине не более 0,5–4,5 мм (в зависимости от толщины кожи). При длительной и интенсивной теплоотдаче организм включает механизмы каскадной ритмической вазоконстрикции – вазодилатации. Эшелонированная тепловая защита организма направлена на предотвращение охлаждения тканей, а если это невозможно – на ограничение охлаждения поверхностными слоями. Максимальный криотерапевтический эффект достигается в момент спазма поверхностных капилляров и не зависит от времени экспозиции. Эффективность локальной криотерапии обусловлена способом и скоростью теплоотдачи.

Клиническими эффектами локальной гипотермии и криотерапии являются:

– улучшение оттока лимфы из тканей, что способствует ликвидации отеков;

– улучшение микроциркуляции крови в тканях, увеличение артериального кровотока и венозного оттока, уменьшение накопления жидкости в полостях (выпот) и, следовательно, уменьшение отеков и фильтрации васкулярного происхождения;

– миорелаксация – ликвидация мышечных контрактур и снижение базального мышечного тонуса;

– улучшение трофики костной, хрящевой ткани и соединительной тканей;

– снижение болевой чувствительности;

– стимуляция регенераторных механизмов;

– противоотечный (противовоспалительный) эффект и ускорение репаративных процессов.

Локальная криотерапия применяется для лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов со вторичным

воспалительным компонентом, заболеваний позвоночника (воспаления и перерождения), воспаления мягких тканей, коллагенозов, фибромосиндрома, аутоиммунных заболеваний, ожогов, трофических язв и т. д. Во время оказания первой помощи при ожогах охлаждение позволяет быстро купировать действие гипертермии и, следовательно, уменьшить зону крионекроза. Охлаждение ожоговых ран струей холодного газа уменьшает боли, улучшает микроциркуляцию, снижает плазмопотери и отек тканей. Объектом обработки в поздние сроки становятся раны с вялой грануляцией в процессе их подготовки к пластическому закрытию. Криообработка способствует уменьшению отека грануляций, их уплощению, подсушиванию и, как итог – хорошему приживлению кожных лоскутов. При лечении трофических язв проявляется анальгезирующее, противовоспалительное и регенерирующее действие локальной криотерапии.

Основная цель криохирургии – разрушение (криодеструкция) патологических очагов и удаление с использованием криоадгезии (холодового прилипания) кусочков пораженной ткани и структурных элементов (криоэкстракция). Криодеструкция формирует зону крионекроза, в которой клетки гибнут в результате действия на них продуктов распада. Другими факторами, ответственными за повреждение в результате криодеструкции, являются нарушения микроциркуляции и гипоксия. В окружающем зону крионекроза микроциркуляторном русле замедляется кровоток, образуются тромбы. Такие изменения наблюдаются чаще всего в венулах, затем в капиллярах. Изменения в системе кровотока после криовоздействия формируются в течение 3–5 ч и соответствуют сосудистой реакции при воспалении.

Преимущества криохирургии по сравнению с другими методами хирургического вмешательства:

- отсутствие грубых послеоперационных рубцов;
- возможность деструкции тканей в труднодоступных местах;
- отсутствие кровотечений;
- возможность точечной деструкции;

– локализация метастазирования из-за ограничения поступления крови из зоны деструкции в другие части тела.

Криохирургия применяется в проктологии, урологии, гинекологии, офтальмологии, отоларингологии, нейрохирургии, гастроэнтерологии, кардиологии, дерматологии и общей хирургии.

В современных криомедицинских установках в зависимости от области применения криохирургических устройств и выбора хладоагента, помимо охлаждения, основанного на разнице температур рабочего тела (хладоагента) и охлаждаемого объекта, используют следующие методы:

– охлаждение за счет теплоты фазового перехода хладоагента;

– охлаждение за счет расширения рабочего тела в дроссельных устройствах и детандерах (эффект Джоуля-Томсона);

– термоэлектрическое охлаждение (эффект Пельтье).

При использовании первых двух методов теплообменник или холодопроизводящая часть системы охлаждения могут быть установлены в рабочей части криоинструмента. При выносе теплообменника в нерабочую часть криоинструмента отвод тепла от тканей к теплообменнику может осуществляться через подводящий элемент, например стержень с высокой теплопроводностью. При термоэлектрическом охлаждении отвод тепла осуществляется, как правило, через подводящий элемент.

Криохирургические установки могут либо генерировать холод, либо использовать готовый хладоагент. Использующие готовый хладоагент устройства различаются степенью автономности. Хладоагент может поступать в криоинструмент из сосуда Дьюара стационарного устройства либо конструкция криоинструмента может предусматривать заправку его хладоагентом. В иструментах автономного типа со встроенным резервуаром для жидкого азота подача хладоагента к наконечнику осуществляется благодаря создаваемому в резервуаре давлению (в результате пассивного или активного нагрева) или откачке паров отработанного хладоагента.

Поскольку рабочая часть криоинструментов обычно охлаждается до температур, при которых возникает криоадгезия, для

исключения повреждения здоровых тканей (особенно при внутриполостных операциях) в рабочую часть некоторых криоинструментов монтируется электронагреватель.

Криоинструменты можно разделить на криоаппликаторы и криооросители. Криоорошение применяется при обработке наружных поверхностей тела и внутриполостных операциях и не предусматривает контакта устройства с зоной криовоздействия. Трубка для подачи хладоагента может быть вмонтирована, например, в эндоскоп. При этом зона криоорошения определяется с помощью стекловолоконной оптики.

Криаппликаторы, предназначенные для инвагинального, ректального и внутричерепного применения, называют криозондами. Криопликаторы для наружного применения снабжены комплектом сменных наконечников. Криохирургические установки могут иметь комплект сменных криоинструментов, отличающихся размерами и формой рабочей части.

Для внедрения в практику научных разработок Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в области низкотемпературного консервирования биологических объектов, гипотермии, криотерапии и криохирургии в 1974 году было создано самостоятельное подразделение – Опытное производство, которые в 1980 году было преобразовано в Специальное конструкторско-технологическое бюро с Опытным производством Института проблем криобиологии и криомедицины (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины).

В настоящее время СКТБ с ОП занимается разработкой, изготовлением и внедрением в технологические процессы оборудования, обеспечивающего долгосрочное хранение, переработку биоматериалов, производство биопрепаратов. В частности, разработаны и успешно используются в биологии и медицине:

– замораживатели программные, предназначенные для низкотемпературного консервирования различных биоматериалов (рис. 2);

– криобанки «под ключ» (рис. 3);

Рис. 2. Замораживатели программные: А – ЗП10; Б – ЗП6.

– сублимационные сушки с загрузкой от 1 до 25 л биоматериала за цикл для производства лиофилизированных препаратов (рис. 4);

– установки для фракционирования плазмы крови УФП1, сублимационной сушки УСС25 и замораживания жидкостей во флаконах УЗФ1;

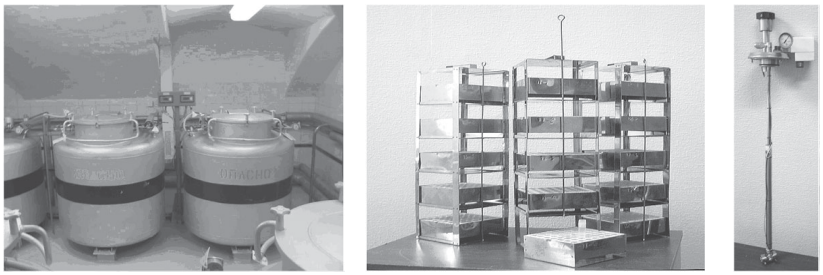


Рис. 3. Оборудование для криобанка.

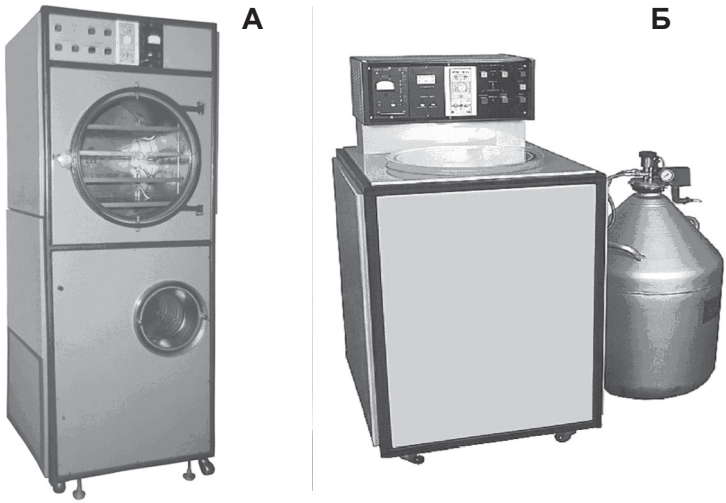


Рис. 4. Сублимационные сушки камерного (А) и коллекторного (Б) типов.

– система контроля криогенного банка для контроля и измерения параметров процесса низкотемпературного хранения биообъектов в криобанке.

Кроме того, СКТБ с ОП создало базовые конструкции установок, которые осуществляют технологический процесс консервирования:

– низкотемпературные системы охлаждения на базе холодильных агрегатов, жидкого азота, элементов Пельтье;

– камеры охлаждения, позволяющие замораживать биоматериалы в контейнеры типа «соломинка», ампулы, флаконы, пластиковые мешки, металлические плоские фляги и др.;

– системы управления, реализующие многоэтапные программы охлаждения в камере или контейнере, с возможностью инициирования кристаллизации.

В СКТБ с ОП разработаны и в настоящее время проходят конструкторско-технологические испытания установки для локального криовоздействия (криодеструктор и гипотерм).

Переработка компонентов крови осуществляется установками реакторного типа с камерами емкостью 40–300 л с целью фракционирования плазмы крови по методу Кона и установки для низкотемпературного замораживания биоматериалов на внутренней поверхности флаконов перед сублимационным высушиванием, которые позволяют значительно интенсифицировать процесс и обеспечить высокое качество лиофилизированного препарата.

Созданы приборы для измерения и регулирования температуры, давления, уровня криогенных жидкостей в криохранилищах, системы учета «движения» образцов в хранилищах криобанков.

Создана установка для локальной воздушной криотерапии («Крио-ЛВК»), криокосметологии, криоанальгезии и криоаккупунктуры. Она мобильна, экономична, проста в эксплуатации, обеспечивает фильтрацию и охлаждение сухой воздушной струей до –35°С и работает от электросети, не требует длительной подготовки и больших затрат материалов, а также специального обслуживания. Охлажденная воздушная среда подается по гибкому шлангу на любой участок тела, а различные насадки позволяют проводить процедуру по оптимальной схеме. Подача (поток) холодного воздуха дозируется, а температура охлажденной воздушной струи плавно регулируется для охлаждения определенного участка тела и исключения возможности повреждения кожи. Системы антиобледенения обеспечивают ровную и бесперебойную работу в течение нескольких часов. На дисплее указываются все параметры, необходимые для эффективного проведения процедуры. Кратковременность и комфортность криотерапии с помощью локальной криоустановки позволяет обслуживать большое количество пациентов с различными заболеваниями.

Воздушная криотерапия сокращает общее время лечения, снимает боль и воспаление, улучшает циркуляцию крови, двигательные способности при следующих патологиях:

– острые и хронические заболевания опорно-двигательного аппарата и суставов;

– первичные хронические полиартриты;

– ревматические заболевания мягких тканей;

– бурситы;

– дисторсия, гематома, отечность;

– послеоперационные и послеродовые боли, опухоли.

В настоящее время в СКТБ с ОП создан замораживатель эмбрионов «Freeze Control», который в зависимости от технического задания имеет 4 или 8 предынсталлированных программ. Например, могут быть предусмотрены программы замораживания, которые используются при криоконсервировании эмбрионов коровы в криозащитных средах, содержащих в качестве криопротектора глицерин или этиленгликоль. Замораживатель эмбрионов «Freeze Control» способен реализовывать низкие (ниже 0,1 град/мин) скорости охлаждения при криоконсервировании биообъекта. В качестве охлаждающей среды в системе используются пары жидкого азота, а для регулировки температуры – термоконтролер. Предусмотрены остановка процесса охлаждения и выдержка при постоянной температуре в любой точке рабочего диапазона от 20 до –43°С, а также возможность сидинга.

Предложены четыре модели криокамер, которые обеспечивают простоту доступа во время загрузки, ручного сидинга и изъятия образцов. Для осуществления заданного режима охлаждения используются программируемые термоконтролеры CL5500 и CL2200 с замкнутым сервоконтуром, которые обеспечивают надежную и точную реализацию заданного режима охлаждения.

Основной задачей СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины на ближайшее время является создание оборудования для реализации разработанных в Институте проблем криобиологии и криомедицины технологий долгосрочного хранения компонентов крови с целью создания криобанков для долгосрочного хранения компонентов крови во всех регионах Украины.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка,1994. –143 с.
2. Calcott P.H. Freezing and thawing microbes. – Shildon: Meadrield Press, 1978. – 125 p.
3. Ieropoli S., Masullo P. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (Crassostrea gigas) // Cryobiology. – 2004. – Vol. 49, №3. – P.250–257.
4. Jin B., Kusanagi K., Ueda M. et al. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival // Cryobiology. – 2008. – Vol. 56, №3. – P. 233–240.
5. Mazur P., Leibo S.P., Chee E.H.Y. A two factors hypothesis of freezing injury // Cell. Res. – 1972. – Vol. 71. – P. 345–385.
6. Pinisetty D., Huang C., Dong Q. et al. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish Xiphophorus maculates // Cryobiology. – 2005. – Vol. 50, №3. – P. 250–263.

3. Фундаментальные и прикладные аспекты криомедицины

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины

Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза

А.Н. Гольцев, Л.В. Останкова, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, М.В. Останков, Ю.А. Гаевская, Н.Н. Бабенко, И.В. Рассоха, О.В. Сафранчук, Н.А. Бондарович, Е.Е. Ямпольская, Е.А. Порожан, А.Ю. Димитров, О.В. Челомбитько, Н.Ф. Губина, К.А. Гольцев, И.Г. Гриша, М.А. Кравченко, О.Ю. Кожина, П.А. Борисов, Л.А. Носенко

Отдел криопатофизиологии и иммунологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
электронная почта: cryopato@rambler.ru

В отделе криопатофизиологии и иммунологии ИПКиК НАН Украины, начиная со времени его образования в 1993 году, выполняются комплексные экспериментальные исследования по изучению влияния низких температур на биологические объекты различного происхождения, включая продукты фетоплацентарного комплекса (ПФПК). Этот материал представляет собой один из главных компонентов терапии, названной ее основоположником академиком В.И. Грищенко клеточной и тканевой терапией [38]. Речь идет об исследованиях, целью которых является экспе-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 501–612.
© А.Н. Гольцев, Л.В. Останкова, Т.Г. Дубрава и др., 2012

Используемые сокращения

АА – адъювантный артрит
АИЗ – аутоиммунные заболевания
АК – адгезивные клетки
БТПХ – болезнь «трансплантат против хозяина»
ВНК – взрослые нервные клетки
ГК – глюкокортикоиды
ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
ГПЧ – гомогенат плаценты человека
ДМСО – диметилсульфоксид
ЕК – естественные киллеры
ИА – индекс артрита
ИДО – индоламин-2,3-диоксигеназа
ИКК – иммунокомпетентные клетки
ИЛ – интерлейкин
ИПА – индекс пролиферативной активности
ИРИ – иммунорегуляторный индекс
ИС – индекс селезенки
ИЦ – индекс цитотоксичности мононуклеаров селезенки в отношении эритроцитов кур
ИФН-γ – интерферон-γ
кГПЧ, кКМ, кКФП, кСКП, кФНК – соответствующее сокращение со значением «криоконсервированный»
КВП – клетки взрослой печени
КМ – костный мозг
КОЕ-ГМ – гранулоцитарно-макрофагальные колониеобразующие единицы
КОЕс-8(/12/14) – колониеобразующие единицы в селезенке летально облученных реципиентов на 8-е (/12-е/14-е)сутки после введения биоматериала
КОЕф – колониеобразующие единицы фибробластов
КФП – клетки фетальной печени
КФП-14 (/18) – клетки фетальной печени 14-ти (/18-ти) суток гестации
лРТПХ – локальная реакция «трансплантат против хозяина»
МЖ – молочная железа
МСК – мезенхимальные стволовые клетки
МФС – моноцитарно-фагоцитарная система
мЦИК – мелкодисперсные циркулирующие иммунные комплексы
нКФП, нСКП, нФНК – соответствующее сокращение со значением «нативный»
НСК – нейрональные стволовые клетки
ОБМ – основной белок миелина
оРТПХ – острая реакция «трансплантат против хозяина»
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с этапом обратной транскрипции
ПДС – пропандиосахароль
ПП – перитонеальная полость
ПФПК – продукты фетоплацентарного комплекса
РА – ревматоидный артрит
РМЖ – рак молочной железы
РС – рассеянный склероз
РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»
СИФ – средняя интенсивность флюоресценции
СК – стволовые клетки
СКК – стволовые кроветворные клетки
СКЛ – смешанная культура лимфоцитов
СКП – суспензия клеток плаценты
СКФ – стволовоклеточный фактор
СРК – стволовые раковые клетки
Суспензия КД – суспензия клеток плаценты, криоконсервированная с 10% диметилсульфоксидом
Суспензия КП – суспензия клеток плаценты, криоконсервированная с 10% пропандиосахаролем
T_{reg}-клетки – Т-регуляторные клетки
ТРФ-β – трансформирующий ростовой фактор бета
ТСЛП – тимусный стромальный лимфопоэтин
ФИ – фагоцитарный индекс
ФНО-α – фактор некроза опухоли альфа
ФНК – фетальные нервные клетки

ФП – фетальная печень
ФЧ – фагоцитарное число
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
ЦНС – центральная нервная система
ЭАЭ – экспериментальный аллергический энцефаломиелит
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
CAM – cell adhesion molecule
c-FLIP – caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein
MAP2 – microtubule-associated protein 2
NCAM – neural cell adhesion molecule
GFAP – glial fibrillary acidic protein
LT-HSC – long-term culture hemopoietic stem cells
ST-HSC – short-term culture hemopoietic stem cells

риментальное обоснование возможности применения криоконсервированных ПФПК как метода комплексного лечения патологических состояний организма человека аутоиммунного генеза. При всей неоднозначности отношения общества к клеточной и тканевой терапии в настоящее время данный метод широко используется в лечебной практике многих медицинских центров мира [38, 167, 179].

Обоснованность применения подобного метода терапии, прежде всего, связана с присутствием в ПФПК клеток стволового компартмента различного уровня дифференцировки и широкого спектра продуцируемых ими полифункциональных биологически-активных медиаторов [38].

Аутоиммунные заболевания (АИЗ), развивающиеся на фоне разбалансировки гармонично взаимодействующих субстратов нейроиммуноэндокринного блока, представляют серьезную медицинскую проблему как с точки зрения их диагностики, так и лечения [12, 94, 102]. Поэтому для коррекции состояния каждой из составляющих, как и общего ансамбля этого блока, перспективным может быть использование именно ПФПК, обладающих потенциалом надклональной системной регуляции [38, 65]. На примере АИЗ, являющихся мультифакториальными заболеваниями, можно проследить как общие механизмы развития многопрофильного патофиологического процесса, так и особенности влияния на него широкого спектра применяемых ПФПК. Экспериментальные исследования в этом направлении и их результаты являются основополагающими для подтверждения состоятельности такой концепции. Очевидно, что расшифровка механизма действия

ПФПК является ключевым моментом совершенствования и повышения эффективности их применения в комплексной терапии различных видов АИЗ.

Обязательным компонентом общего технологического процесса аппликации ПФПК в клинической практике является криоконсервирование. Этот метод позволяет создавать их запасы и использовать по мере востребованности с обязательной предварительной сертификацией [38]. В отделе криопатофизиологии и иммунологии ИПКиК НАН Украины ведутся исследования, направленные на выяснение механизмов многовекторного влияния на биообъект физико-химических факторов криоконсервирования, которое определяется как спектром этих факторов, так и исходным состоянием биообъекта [46, 130, 132]. В наших ранних работах было показано, что после криоконсервирования в кроветворных клетках развиваются нелетальные повреждения, вызывающие временную ингибицию скорости их пролиферации и дифференцировки, снижение способности распознавать микроокружение и расселяться в нем и т. д. [23, 47, 71, 130]. Тем не менее остаются открытыми многие вопросы относительно конкретных причин, вызывающих такого рода изменения. В частности, вида используемых криопротекторов, режимов криоконсервирования и обусловленной этим модификации состояния мембранных структур, механизмов внутриклеточного сигналирования, их дальнейшей реализации в клетке за счет процессов транскрипции, трансляции с возможным дальнейшим изменением наработки структурных и регуляторных пептидов [69, 133, 165]. Продемонстрирована также зависимость ответа на факторы криоконсервирования клеток стволового компартмента от их исходного структурно-функционального статуса. Показано, что варьирование условий криоконсервирования позволяет управлять функциональным статусом стволовых клеток. Другими словами, используя определенные режимы криоконсервирования, можно обеспечивать не только «оптимальную» сохранность стволовых элементов из разных источников с различным исходным функциональным статусом, но и направленно регулировать их потенциал [132]. Исследования в этом направлении являются актуальными как в теоретическом, так и прикладном аспектах, открывая перспективы оптимизации

методов и повышения терапевтического потенциала препаратов клеточной и тканевой терапии.

1. Исходное состояние как фактор, определяющий криолабильность стволовых клеток из разных источников

1.1. Криоконсервирование гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга взрослого организма и фетальной печени

Стволовые кроветворные (СКК) и мезенхимальные (МСК) клетки – уникальные хранилища информации, необходимой для реализации адекватных программ пролиферации и дифференцировки [86, 226] гемопоэтической системы фетуса и взрослого организма.

Иерархия СКК представляет собой различные стадии дифференцировки входящих в ее состав клеток, в основе которой лежит функционально тотипотентная СКК (long-term culture hemopoietic stem cells – LT HSC) [125, 150], способная восстанавливать кроветворную систему на протяжении всей жизни. Эта клетка продуцирует менее потентные СКК (short-term culture hemopoietic stem cells – ST HSC), которые, в свою очередь, формируют линейно-коммитированные предшественники всего спектра зрелых клеток крови [140].

Сравнительный анализ количественных и качественных характеристик СКК из разных источников продемонстрировал их отличия по ряду параметров [228]. Например, способность формировать колонии в селезенке летально облученных реципиентов проявляют СКК костного мозга (КМ), которые, по мнению ряда исследователей [162, 214], уже продвинуты в дифференцировке (ST HSC) по сравнению с мультипотентными СКК фетальной печени (ФП) ранних сроков гестации (LT HSC).

Важно, что по мере дифференцировки СКК изменяются репертуар и степень экспрессии различных мембранных молекул, что обуславливает их хоминг* при введении реципиентам [219].

*Хоминг (от англ. homing) – способность клеток к направленной миграции.

Адаптируясь к условиям микроокружения и отвечая на местные регуляторные сигналы, СКК донора могут как изменять свой статус под их влиянием, так и выступать в роли продуцентов ауто- и паракринных регуляторных медиаторов, модифицируя состояние реципиента. Следовательно, такая пластичность и многопрофильность структурно-функциональных характеристик СКК *a priori* делают их чувствительной мишенью для физико-химических факторов криоконсервирования. Таким образом, исходное состояние СКК может определять функциональную активность деконсервированного материала [11, 24].

Отмечены особенности изменения показателей сохранности и количества ядросодержащих клеток взрослого КМ и ФП (14 суток гестации) при использовании идентичных режимов замораживания (рис. 1). Так, режим 1 (Р1) с 5%-м раствором диметилсульфоксида (ДМСО) и режим 2 (Р2) с 10%-м раствором ДМСО предусматривали охлаждение от комнатной температуры до –25°С со скоростью 1 град/мин; режим 3 (Р3) с 5%-м раствором ДМСО и режим 4 (Р4) с 10%-м раствором ДМСО – охлаждение от комнатной температуры до –25°С со скоростью 1 град/мин, выдержку

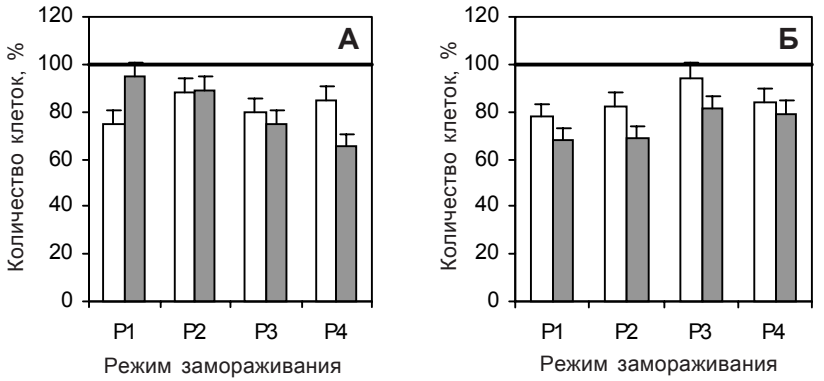


Рис. 1. Количество КМ (А) и ФП (Б) после криоконсервирования по различным режимам: □ – сохранных (по тесту с трипановым синим); ▩ – ядерных; за 100% принято количество клеток до замораживания.

в течение 10 мин, затем охлаждение со скоростью 10 град/мин до –80°С с последующим погружением ампул в жидкий азот. Приведенные данные, полученные с помощью экспресс-методов оценки клеток гемопоэтической ткани из различных источников после криоконсервирования, позво-ляют предположить преимущество использования Р2 для клеток КМ и Р3 для клеток ФП.

Оценка содержания клеток с маркерами СКК ($CD34^+CD38^-$) показала существенную зависимость данного показателя как от вида материала при использовании идентичного режима замораживания, так и от режима замораживания при криоконсервировании клеток КМ или ФП (рис. 2).

Другими словами, реакция СКК с фенотипом $CD34^+CD38^-$ из КМ и ФП на действие физико-химических факторов, реализуемых в процессе замораживания, разная. Одна из возможных причин повышения концентрации СКК в суспензии после криоконсервирования – экспрессия данного маркера на клетках, которые до криоконсервирования были «негативны» по нему, причем интенсивность подобных модификаций определяется видом биоматериала. Степень изменения уровня экспрессии мембранных структур СКК в ответ на криовоздействие может зависеть и от вида рецепторов. Показано, что после криоконсервирования КМ около 15% Thy-$1,2^+$ – миелокариоцитов (исходный показатель их содержания принят за 100%) сохраняли этот маркер, тогда как в популяции СКК, которые формируют колониеобразующие единицы в селезенке летально облученных реципиентов

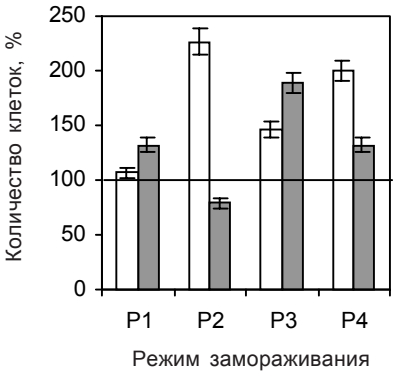


Рис. 2. Содержание клеток с маркерами СКК ($CD34^+CD38^-$) в КМ (□) и ФП (▩) после криоконсервирования с различными режимами замораживания; за 100% принято содержание клеток с исследуемыми маркерами в нативном КМ (0,030 ± 0,004%) и ФП (0,035 ± 0,002%) – контроль.

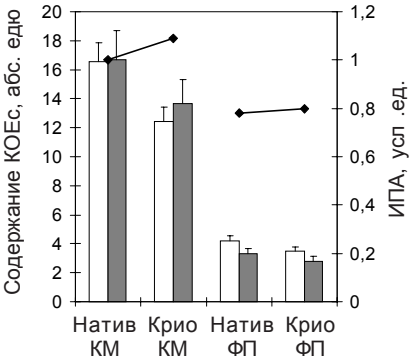


Рис. 3. Содержание КОЕс в селезенках летально облученных реципиентов после введения криоконсервированных клеток КМ (Р2) и ФП (Р3); □ – КОЕс-8; ▩ – КОЕС-14; — – индекс пролиферативной активности ИПА = КОЕс-14/КОЕс-8.

(КОЕс) [211] – не более 6%. Известно, что рецептор Thy-1,2 отвечает за хоминг СКК [11], а его шеддинг* после криоконсервирования может быть причиной установленного нами факта более позднего расселения СКК в гемопоэтическом плацдарме после трансплантации КМ [130].

Функциональная полноценность СКК из разных источников была оценена по их способности формировать колонии в селезенке летально облученных реципиентов в системе *in vivo* [211]. Показано максимальное повышение количества селезеночных колоний после внутривенного введения клеток криоконсервированного КМ (кКМ) и клеток криоконсервированной ФП (кКФП) при использовании режимов Р2 и Р3 соответственно (рис. 3).

Известно, гемопоэтические стволовые клетки ФП относятся к мультипотентным СКК (LT-HSC) [109], активность которых контролирует стволовоклеточный фактор (СКФ) [229]. Высокий репликативный потенциал этих клеток, способность дифференцироваться в различные формы клеток кроветворной системы, защищать от гибели летально облученных реципиентов подтверждены результатами многих работ [29, 113, 181]. Тем не менее, даже при сходном содержании $CD34^{+}CD38^{-}$-клеток в исследуемых КМ ((0,030 ± 0,004)%) и ФП ((0,035 ± 0,002)%), колониеобразующий потенциал ФП был существенно ниже КМ (рис. 3). Следовательно, селезеночное микроокружение не является «оптимальным» для

*Шеддинг (от англ. shedding) – схождение рецепторов с поверхности мембраны клеток после воздействия каких-либо физико-химических факторов.

проявления колониеобразования LT-HSC ФП. Вероятно, что субпопуляция даже более потентных клеток, которые способны формировать колонии в селезенке летально облученных реципиентов на 14 сутки (КОЕс-14) после введения биоматериала, является лишь малой частью LT-HSC. Более того, возможно, что $CD34^+CD38^-$-маркер в большей степени присущ LT-HSC, чем колониеобразующим единицам селезенки (КОЕс). Подтверждением этому является и тот факт, что, даже после криоконсервирования КМ в соответствии с Р2 и ФП по Р3 на фоне повышения в них концентрации $CD34^+CD38^-$-клеток (см. рис. 2), их колониеобразующая активность не увеличивалась (рис. 3, 4).

В 1973 году А.Я. Фриденштейном была разработана методика клонирования колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) КМ, которые создают стромальное микроокружение для СКК [68]. Данный метод подразумевал культивирование клеток КМ *in vitro* с плотностью эксплантации 1×10^4 клеток/см^2 в присутствии облученных (доза 5 Гр) фидерных клеток КМ морской свинки. Современные данные свидетельствуют, что МСК, входящие в состав КОЕф, способны к самообновлению и мультилинейной дифференцировке в производные мезенхимы (костную, хрящевую, жировую, мышечную ткань, строму и сухожилия и т. д.). Достаточно широк и спектр фенотипических маркеров МСК, к которым относятся CD105 (SH-2), CD129, CD166 (ALKAM), CD90 (Thy1), CD44, CD106 (VCAM-1), ICAM-2, LFA-3, SH-4, STRO-1, Ska-1, CD71, CD10, CD13, CD29, CD63, CD73/SH-3, CD-120a, CD-124, SSEA-1, SSEA-4, GD2 [48, 85].

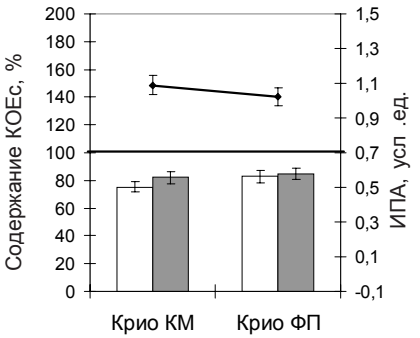


Рис.4. Колониеобразующий потенциал СКК (КОЕс) КМ (Р2) и ФП (Р3) после криоконсервирования (100% – количество колоний, образованных КОЕс нативного материала; □ – КОЕс-8; ■ – КОЕС-14; —— – ИПА = КОЕс-14 / КОЕс-8).

Плюрипотентность МСК определяется высокой сте-пенью их чувствительности к измененному цитокиновому профилю организма реципиента. Этим обусловлена миграция МСК в область повреждения с проявлением регенеративной функции [48, 87]. Относительная простота выделения МСК и культивирования *in vitro* делает их перспективным материалом для клеточной терапии. МСК могут способствовать регенерации ткани также за счет привлечения дистантно расположенных эндогенных СК в участки повреждения и стимуляции дифференцировки локальных СК [180]. Потенциальные возможности МСК открывают перспективы для их клинического использования при неэффективности других способов терапии.

Особого внимания заслуживает перспектива применения МСК при лечении АИЗ, благодаря их уникальным многопрофильным иммуномодулирующим свойствам и, в первую очередь, способности снижать активность эффекторных клеток иммунной системы. Иммуномодулирующая активность МСК реализуется либо опосредованно через модуляцию состояния дендритных клеток, Т-регуляторных клеток (T_{reg}), функция которых соподчинена активности фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) [48, 159] либо через воздействие на функции естественных киллеров (ЕК), Т-лимфоцитов $CD4^+$ и $CD8^+$, тканевых макрофагов [72], секретирующих иммуносупрессорные медиаторы: трансформирующий ростовой фактор β (ТРФ-β), гепатоцитарный фактор роста, простагландин Е2.

Для использования в клинической практике МСК и СКК необходимо их низкотемпературное консервирование и хранение. В большинстве протоколов криоконсервирования МСК используют среды с 5–20% ДМСО и скорость охлаждения от 1,0 до 2,0 град/мин [122, 230]. Предпочтение отдается медленному замораживанию, которое позволяет избегать формирования внутриклеточных кристаллов льда, а также осмотического повреждения клеток.

Как указывалось выше, функциональный статус МСК определяется их рецепторным «репертуаром» [85], поэтому использование этого показателя как одного из компонентов оценки эффективности криоконсервирования МСК вполне оправдано.

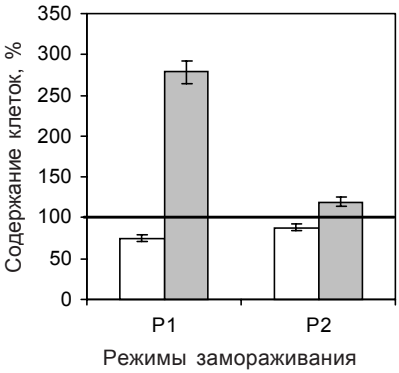


Рис. 5. Содержание клеток с фенотипическими маркерами МСК в криоконсервированном КМ мышей в зависимости от режима; ☐ – ядросодержащих клеток; ▩ – $CD73^{+}CD105^{+}$-клеток; за 100% приняты содержание клеток с исследуемыми маркерами и количество ядросодержащих клеток в нативном КМ (контроль).

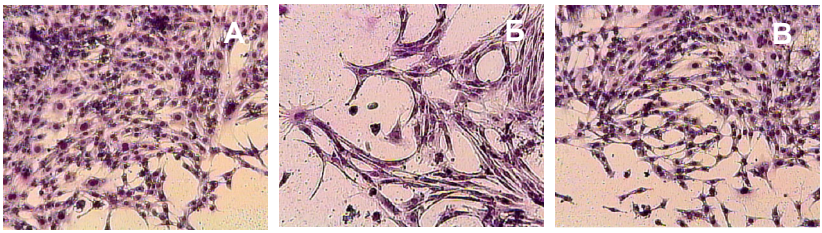


Рис.6. Колонии, образованные МСК (КОЕф) КМ до и после криоконсервирования: А – нативный КМ;Б – криоконсервированный по Р1; В – криоконсервированный по Р2. Окрашивание по Романовскому-Гимза, на 14-е сутки культивирования, х400.

Как видно из рис. 5, криоконсервирование даже с одной и той же скоростью охлаждения (1 град/мин до –25°С с последующим погружением в жидкий азот), но с разной концентрацией криопротектора (Р1 – 5% ДМСО и Р2 – 10% ДМСО) по-разному изменяло содержание клеток с фенотипическими характеристиками МСК ($CD73^{+}CD105^{+}$) КМ мышей линии СВА/Н.

Влияют ли изменения «репертуара» мембранных структур МСК после криоконсервирования на КОЕф, оцененную по классическому методу А.Я. Фриденштейна?

Как видно из рис. 6, криоконсервирование клеток КМ согласно Р1 и 2 существенно изменяло архитектонику образованных КОЕф. Так, в случае использования Р1 в данных культуральных условиях

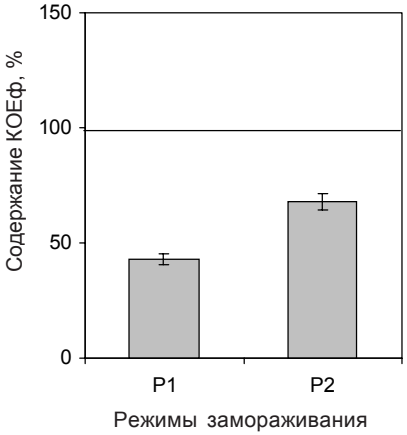


Рис. 7. Количество колоний, образованных МСК (КОЕф) КМ в культуре *in vitro*, 14 суток культивирования. (100% – количество колоний, образованных КОЕф нативного материала).

формировались колонии, по плотности сходные с нативными*, а криоконсервирование согласно Р1 приводило к появлению колоний с менее плотной ажурной структурой. Независимо от режима количество колоний, формируемых криоконсервированными МСК, было достоверно ниже натива (рис. 7). Более того, несмотря на увеличение в общем пуле концентрации клеток с маркерами МСК ($CD73^+CD105^+$), после криоконсервирования согласно Р1 колониеобразующая активность такого КМ (КОЕф) была в 2 раза ниже по сравнению с таковой при использовании Р2. То есть увеличение содержания клеток, экспрессирующих указанные маркеры МСК, после криоконсервирования не коррелировало с колониеформирующей активностью КМ. Подобная закономерность была отмечена нами и при сравнительной оценке фенотипических и функциональных характеристик КОЕс КМ и ФП после криоконсервирования. Возможно, эти результаты в большей степени соответствуют тому, что экспрессия определенных мембранных структур на негативных по этому маркеру клетках может свидетельствовать даже об агрессивности режима криоконсервирования [35, 133]. К тому же из двух режимов Р2 был «оптимальным» в обеспечении функционального потенциала не только МСК, но и СКК КМ, для которых, как отмечалось выше, МСК являются важным компонентом проявления их функционального статуса.

*Нативный – здесь и далее подразумевается материал, не подвергавшийся воздействию факторов криоконсервирования.

Неоднократно отмечалось, что МСК и СКК фетальных тканей имеют ряд существенных различий по сравнению с такими же клетками взрослого организма. Более того, характеристики СКК и МСК ФП в значительной степени зависят от сроков гестации [23]. Действительно в процессе эмбриогенеза структурно-функциональные характеристики формируемых в печени СКК и МСК, включая рецепторный репертуар, профиль продуцируемых регуляторных медиаторов, экспрессию генов пролиферации и дифференцировки и др., существенно изменяются [119, 125, 133, 199, 234].

Проведенный нами сравнительный анализ структурно-функционального потенциала СКК и МСК фетальной печени показал не только различия их качественно-количественных характеристик в зависимости от срока гестации, но и их разный ответ на действие факторов криоконсервирования после использования Р2.

Цитофлуориметрический анализ установил, что с увеличением срока гестации в нативной ФП снижалось содержание клеток с фенотипом СКК – $CD34^{+}CD38^{-}$ и увеличивалось содержание МСК -подобных клеток $CD73^{+}CD105^{+}$ (рис. 8, 9). Один и тот же режим криоконсервирования по-разному влиял на содержание в ФП этих клеток в зависимости от срока гестации (рис. 8).

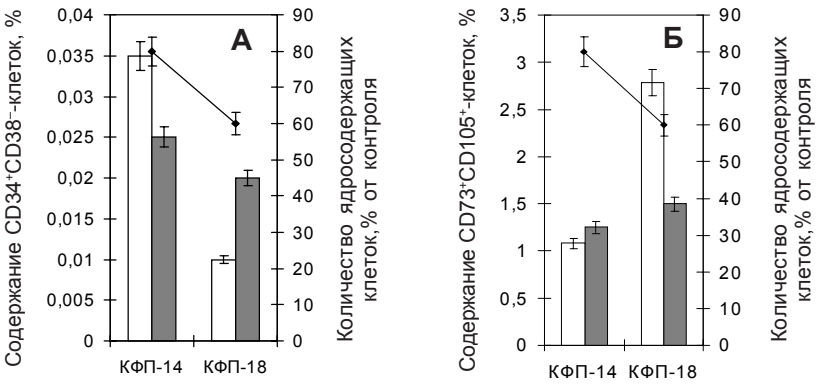


Рис. 8. Содержание клеток $CD34^{+}CD38^{-}$ (А) и $CD73^{+}CD105^{+}$ (Б) в ФП разных сроков гестации до (□) и после (■) криоконсервирования; ⎯⎯ – количество ядросодержащих клеток.

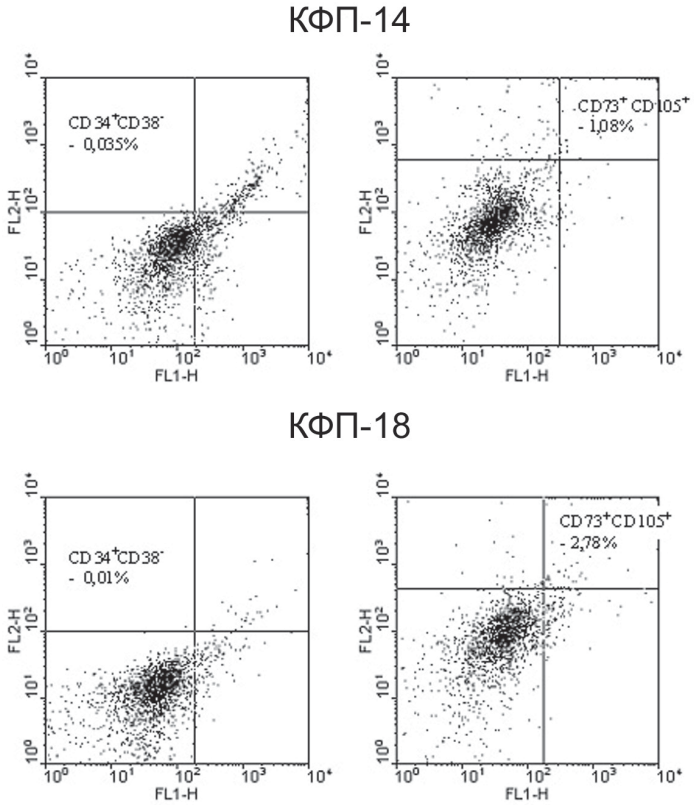


Рис. 9. Цитофлуориметрический анализ содержания СКК ($CD34^+CD38^-$) и МСК ($CD73^+CD105^+$) в нативной ФП разных сроков гестации.

Так, в криоконсервированных КФП 14 суток гестации (кКФП-14) содержание СКК ($CD34^+CD38^-$) снижалось примерно на 30%, тогда как в криоконсервированных КФП 18 суток гестации (кКФП-18) увеличивалось в 2 раза по сравнению с нативом (рис. 8, А). Оценка *in vivo* колониеобразующего потенциала СКК в селезенке летально облученных реципиентов продемонстрировала иные результаты (рис. 10). Так, криоконсервирование КФП-14 вызывало снижение колониеобразования как КОЕс-8, так и КОЕс-14 по

сравнению с нативом. В клетках ФП 18 суток гестации после криоконсервирования функциональный потенциал КОЕс-8 также снижался, а более потентных КОЕс-14 – повышался, но в меньшей степени, чем при фенотипической оценке. Такой феномен базируется на экспериментально подтвержденной концепции о возможности «ревитализации» под действием факторов криоконсервирования функционального потенциала КФП поздних сроков гестации до уровня более ранних [23, 133]. В таком случае оба показателя (фенотипическая принадлежность к пулу стволовых элементов и функциональный статус), имея общую тенденцию изменений после криоконсервирования, определяют структурные и функциональные параметры СКК.

При оценке общего характера влияния криоконсервирования на КФП получены данные, которые свидетельствуют о необходимости отработки «оптимальных» условий криоконсервирования для биообъекта с конкретными исходными параметрами. Вместе с тем эти результаты ориентируют нас на возможность использования криоконсервирования не только как метода обеспечения «абсолютного» сохранения исходного состояния биообъекта, но и управления его внутренним состоянием при варьировании условий криоконсервирования.

Подтверждением этого тезиса являются результаты аттестации состояния МСК ФП. Кроме определения содержания в ФП клеток с фенотипом $CD73^{+}CD105^{+}$ методом проточной цитофлуориметрии, было проведено культивирование *in vitro* выделенных с помощью иммуномагнитного сортирования $CD105^{+}$-клеток ФП для

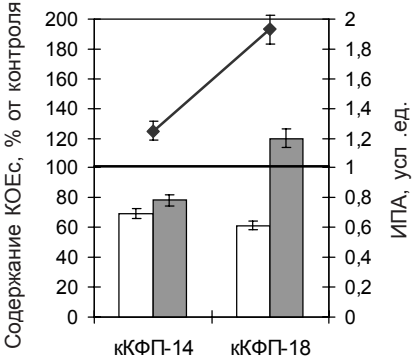


Рис. 10. Колониеобразующий потенциал СКК (КОЕс) ФП разных сроков гестации после криоконсервирования (100% – количество колоний, образованных КОЕс нативного материала для каждого срока гестации; □ – КОЕс-8; ■ – КОЕС-14; —— – ИПА = КОЕс-14/КОЕс-8).

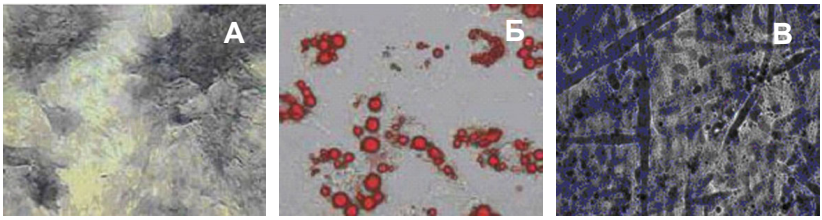


Рис. 11. Индуцированная дифференцировка МСК в направлениях: А – остеогенном (экспрессия щелочной фосфатазы), Б – адипогенном (окраска масляным красным) либо В – миогенном (формирование миотуб), х400.

подтверждения их принадлежности к МСК. Под действием специфических индукторов эта фракция клеток дифференцировалась в остеогенном, адипогенном и миогенном направлениях, что доказывает их принадлежность к МСК (рис. 11).

После криоконсервирования КФП-14 содержание среди них $CD73^{+}CD105^{+}$-клеток (см. рис. 8, Б) достоверно не изменялось, однако их колониеобразующий потенциал был в 1,7 раза ниже нативного контроля (рис. 12). То есть определенная часть фенотипически относящихся к МСК клеток утрачивала колониеформирующую активность. Нативные КФП-18 (нКФП-18) содержали в 3 раза больше $CD73^{+}CD105^{+}$-клеток, чем в КФП-14 (нКФП-14). Этот показатель, хотя и снижался в 2 раза после криоконсервирования, однако оставался выше, чем в кКФП-14. Колониеобразующий потенциал МСК кКФП-18 после криоконсервирования превосходил аналогичный показатель кКФП-14. Описанный феномен свидетельствует, с одной стороны, о большей криочувствительности МСК по сравнению с СКК в КФП-18, с другой – о высоком колониеобразующем потенциале у оставшихся функционально полноценных МСК после криоконсервирования.

Таким образом, криоконсервирование согласно определенного режима (Р2: 10% ДМСО, скорость охлаждения 1 град/мин до –25°С с последующим погружением в жидкий азот) вызывает изменения структурных и функциональных характеристик СКК и МСК не только из разных источников, но и в КФП разных сроков гестации.

Более того, на фоне некоторого снижения содержания ядросодержащих клеток выбранный режим способен селективно обогащать КФП-18 клетками с фенотипом СКК (см. рис. 8, А) и обеспечивать высокое содержание функционально активных МСК рис. 12), что необходимо учитывать при прогнозировании их терапевтического потенциала.

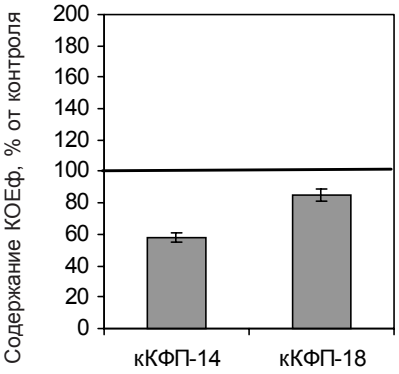


Рис.12. Колониеобразующий потенциал МСК (КОЕф) ФП разных сроков гестации после криоконсервирования (за 100% принято количество колоний, образованных КОЕф нативного материала каждого срока гестации).

Не вызывает сомнения, что реализация функционального потенциала и, как следствие, терапевтического эффекта ФП, в том числе после криоконсервирования, являются результатом функционирования геномно-постгеномных каскадов в клетках ее стволового компартмента [34, 133]. Необходимость исследований на молекулярно-генетическом уровне обоснована данными работ, в которых уже подтверждено изменение функционирования геномных и постгеномных каскадов различных клеток после криоконсервирования [69]. Нами была проведена аттестация состояния двух генов, присущих СКК и МСК, после криоконсервирования. Экспрессию генов *gata2* и *ido* оценивали методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) по протоколу «Diatom RNA Prep100» («Isogene Lab», Россия), «GenePac PCR Core» («Биоком», Россия) в ФП мышей.

Ген *gata2* играет важную роль в раннем гемопоэзе и контролирует самоподдержание СКК [135, 212]. Ген *ido* осуществляет контроль реализации иммуномодулирующей активности МСК за счет продукции уникального по своему потенциалу фермента ИДО, способного активировать супрессорное звено иммунитета [174, 187].

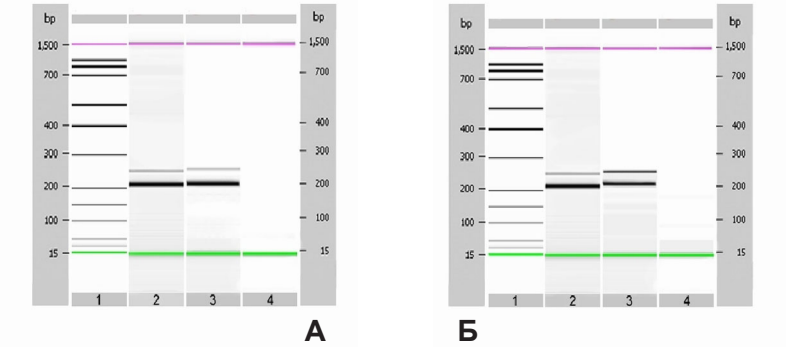


Рис. 13. Детекция транскриптов гена *gata2* в Lin-CD117$^+$ – фракции КПФ-14 (А) и КПФ-18 (Б) до и после криоконсервирования. Верхняя полоса – амплификоны *gata2* (таргетный ген), нижняя – *beta actin* (ген «домашнего хозяйства»); 1 – маркер длины фрагмента, 2 – нативные образцы, 3 – криоконсервированные, 4 – бланк-контроль.

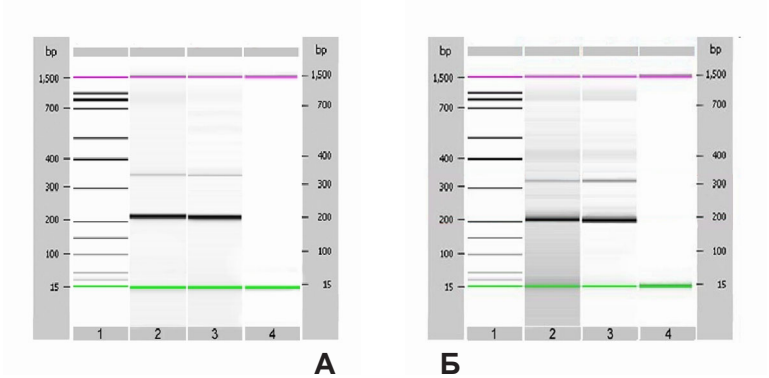


Рис. 14. Детекция транскриптов гена *ido* в CD105$^+$-фракции КФП-14 (А) и КФП-18 (Б) до и после криоконсервирования. Верхняя полоса – амплификоны *ido* (таргетный ген), нижняя – *beta actin* (ген «домашнего хозяйства»); 1 – маркер длины фрагмента, 2 – нативные образцы, 3 – криоконсервированные, 4 – бланк-контроль.

Содержание транскриптов указанных генов определяли как в общей популяции КФП, так и в выделенных с помощью иммуномагнитного сортирования фракциях СКК (CD117$^+$-клетки) и МСК (CD105$^+$-клетки) (рис. 13, 14). Экспрессию генов исследовали

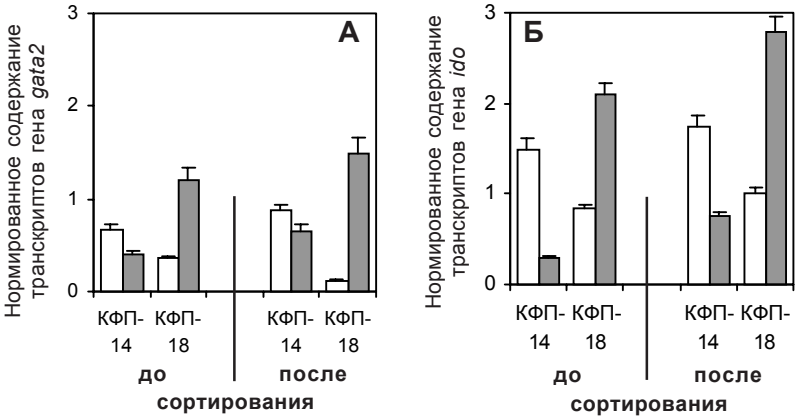


Рис. 15. Полуколичественный анализ экспрессии генов *gata2* (А) и *ido* (Б) в общих суспензиях КФП и соответственно во фракциях $CD117^+$ и $CD105^+$ до (□) и после (■) криоконсервирования: Содержание транскриптов генов *gata2* и *ido* нормировано по гену «домашнего хозяйства».

в течение 60 мин [55] после отогрева материала, криоконсервированного по ранее описанному режиму (Р2).

Представленные данные (рис. 15, А) свидетельствуют о том, что с увеличением срока гестации с 14-го по 18-й посткоитальный день содержание транскриптов гена *gata2* в общем пуле нативных КФП снижалось почти в 2 раза. Криоконсервирование вызывало противоположный эффект, а именно: в КФП-14 содержание транскриптов *gata2* снижалось, тогда как в КФП-18 – увеличивалось.

Экспрессия гена *gata2* в выделенных из КФП фракциях $CD117^+$-клеток повторяла тенденцию общей суспензии, хотя и имела некоторую специфику (рис. 15, А). Прежде всего, в нативной $CD117^+$-фракции КФП-14 она была выше, чем в общем пуле, а в $CD117^+$-фракции КФП-18 – существенно ниже. После криоконсервирования в $CD117^+$-фракции КФП-18, как и в цельной суспензии, была отмечена выраженная стимуляция экспрессии гена *gata2*, причем ее уровень был максимальным по сравнению со всеми образцами. В отношении гена *gata2*, как собственно и СКК в целом, криокон-

сервирование проявило «ревитализирующий» эффект, который был более выражен в выделенной фракции СКК. Важно заметить, что уровень экспрессии гена *gata2* изменялся подобно содержанию $CD34^+CD38^-$-клеток (см. рис. 8, А).

Исследование уровня экспрессии гена *ido* показало, что общая тенденция изменения его экспрессии во всех вариантах оценки совпадала с таковой у *gata2*. Так, в нативных КФП (как в общих суспензиях, так и выделенных $CD105^+$-фракциях) содержание транскриптов гена *ido* с увеличением срока гестации существенно снижалось. Интересно, что такой характер изменения уровня экспрессии гена *ido* в ФП связан с обеспечением иммунного профиля организма при беременности. Известен факт активации материнских клеток-эффекторов в пренатальном периоде на фоне снижения супрессорной функции T_{reg}-клеток [174]. Активность этой субпопуляции Т-клеток снижается по мере уменьшения содержания катаболитов триптофана, формируемых именно под влиянием фермента ИДО. Подтверждением этому является тот факт, что экспериментальная инактивация фермента ИДО 1-метилтриптофаном приводит к отторжению эмбриона [178].

В криоконсервированных КФП-14 мы обнаружили снижение активности гена *ido*, в то время как в КФП-18 – активацию (рис. 15, Б). Интересно, что изменение уровня экспрессии гена *ido* в КФП-18 как в общей суспензии, так и в выделенной $CD105^+$-фракции, и содержание клеток с фенотипическими признаками МСК ($CD73^+CD105^+$) до и после криоконсервирования имели противофазный характер (см. рис. 8, Б). То есть при увеличении количественного содержания этих клеток к 18-м суткам гестации уровень экспрессии гена *ido* в них значительно снижался. Вместе с тем в кКФП-18 со сниженным содержанием МСК, вызванным, по-видимому, как их гибелью, так и шеддингом рецепторов, продукция транскриптов гена *ido* возрастала до уровня, превышающего не только нКФП-18, но и нКФП-14.

Таким образом, «ревитализирующий» эффект криоконсервирования реализуется в КФП поздних сроков гестации как в отношении уровня экспрессии гена *gata2*, ответственного за гемопоэтическую активность СКК, так и *ido*, ответственного за иммуномодули-

рующую активность МСК. Данный результат интересен не только с точки зрения фундаментальной криобиологии, но и его использования в терапии АИЗ.

Представленные результаты подтверждают, что криоконсервирование является фактором управления внутренним состоянием биообъекта, в данном случае пула клеток стволового компартмента КФП, который может реализоваться через модификацию их геномных и постгеномных каскадов.

1.2. Криочувствительность фетальных нервных клеток

Фетальные нервные клетки (ФНК) являются одним из перспективных препаратов клеточной терапии [13]. Криоконсервирование – один из обязательных этапов применения клеток фетального мозга в клинической практике. Данная процедура позволяет хранить и использовать биоматериал по мере востребованности [129]. Функциональный потенциал деконсервированных ФНК определяется как стадией развития гестации фетального мозга и соответственно значительной модификацией клеточной сомы в процессе эмбриогенеза, так и возможным их изменением под влиянием факторов криоконсервирования, реализуемых в процессе замораживания [132]. В настоящее время интенсивно развиваются экспериментальные исследования, касающиеся выяснения природы криолабильности[1] и криостабильности[2] разных клеток и тканей [23], в том числе и ФНК.

Однако сведения о морфологической и функциональной сохранности криоконсервированных ФНК (кФНК), включая стволовые клетки, весьма противоречивы, это можно объяснить большим количеством методических подходов оценки их состояния после замораживания [176].

[1]Криолабильность – повышенная чувствительность изолированных клеток в целом, их мембранных структур, внутриклеточных органелл к действию низких температур.

[2]Криостабильность – устойчивость изолированных клеток в целом, их мембранных структур, внутриклеточных органелл к действию низких температур.

Ранее в этой главе было отмечено, что криочувствительность (криолабильность/криостабильность) биологического объекта определяется как реализацией физико-химических факторов криоконсервирования в отношении биообъекта, так и его исходным состоянием [23]. Например, для клеток эукариот – их типом и размером, нахождением в той или иной фазе клеточного цикла, белок-липидным составом мембран клеток и количеством свободной воды в них, концентрацией замораживаемых клеток и типом контейнера, температурой предподготовки биоматериала, скоростью охлаждения, температурой и длительностью хранения, скоростью оттаивания и т. д. [19]. Одним из наиболее важных факторов предупреждения повреждений клеток после замораживания является состав криоконсервирующей среды. Для ФНК разработаны различные протоколы замораживания с использованием в качестве криопротектора ДМСО в разных концентрациях (от 5 до 20%), глицерина, этиленгликоля и сахаров (трегалозы, сахарозы, глюкозы) [207]. В некоторых работах [221] для повышения выживаемости клеток перед замораживанием использовали предынкубацию ФНК с ингибиторами апоптоза, что не всегда эффективно [176].

Функциональная полноценность ФНК после размораживания подтверждается в условиях как *in vivo*, так и *in vitro* по ряду критериев. Так, наиболее широко и давно используется оценка структурной целостности кФНК, их пролиферативного и дифференцировочного потенциала [176], экспрессии фенотипических маркеров [143], сохранности кариотипа и некоторых других показателей [160]. Некоторые исследования [157, 176] посвящены изучению активности каспазы-3, определению степени экспрессии антиапоптозных белков, работе ионных каналов, генерации потенциала действия.

Особенностями структурной организации различных типов клеток обусловлен выбор протокола криоконсервирования, подразумевающий использование определенной скорости замораживания-оттаивания. Для криоконсервирования ФНК применяют двухэтапное замораживание со скоростью 1 град/мин до температуры –80°С и погружение в жидкий азот [143] (в дальнейшем он будет обозначен как режим II – PII). Для криоконсервирования нейро-

нальных стволовых клеток в виде нейросфер преимущество отдают витрификации [157].

В наших предыдущих исследованиях была подтверждена состоятельность режимов замораживания ФНК, предусматривающих охлаждение клеток от комнатной температуры до –5°С со скоростью 1–1,5 град/мин, температурную инициацию кристаллообразования с последующим охлаждением до –60°С со скоростью 2 град/мин и погружением в жидкий азот [79] (режим I – PI), а также охлаждение со скоростью 1 град/мин до –9°С, температурную «остановку» в течение 10 мин, охлаждение со скоростью 1 град/мин до –25°С, затем 10 град/мин до –60°С и погружение в жидкий азот [80] (режим III – PIII). В последнем режиме учитывалась как необходимость снятия переохлаждения (температурная «остановка» при –9°С) для сохранения акцессорного микроокружения, так и последующее увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин, что важно для функциональной активности недифференцированных предшественников.

Установлено, что исходная жизнеспособность ФНК, полученных от плодов крыс 11 суток гестации, оцененная с использованием пропидий йодида, не превышала 65% (в дальнейшем она была принята за исходные 100% – контроль). Как видно из рис. 16, сохранность ФНК после использования PI и PIII достоверно не отличалась и составляла около 80% от контроля. Установлено значительное снижение числа и сохранности ФНК после использовании PII.

Важным критерием оценки состояния ФНК является адгезивный потенциал [191], который был выбран для определения их функционального статуса после криоконсервирования. Согласно современным данным [227] цитоскелет живых клеток представляет собой динамическую, тонко организованную систему, в значительной степени определяющую структуру клеток и их функциональные свойства. Нервные клетки с помощью молекул адгезии прикрепляются к субстрату и образуют контакты с другими клетками [153]. Адгезивная способность клеток фетальной нейроткани может характеризовать популяционный состав данного материала. Известно, что дифференцировка нервных и глиальных клеток, формирование и рост их отростков начинаются после прикрепления

к какому-либо субстрату на опорной подложке (стекло или пластик). Свойством адгезии к стеклу или пластику обладают только глиальные и соединительнотканные клетки мозговых оболочек и сосудов, в то время как для нейронов необходимы определенные субстраты с поверхностным положительным зарядом [151].

Для определения содержания адгезивных клеток (АК) в общей популяции ФНК был использован метод «преплейтинга», позволяющий количественно оценить число глиальных клеток фетального мозга и получить суспензию, обогащенную нервными клетками [117]. Оценка адгезивного потенциала криоконсервированных клеток фетального мозга показала (рис. 16) наименьшее отклонение данного показателя от контроля после использования PI, при котором реализовалось максимальное снятие переохлаждения образца перед началом кристаллизации [19]. Данный факт особенно важен, учитывая то, что критической при криоконсервировании биоматериала является область фазовых переходов, в которой вероятность возникновения глубоких криоповреждений консервированного материала наибольшая. Режим II не предусматривал подобного снятия переохлаждения. При медленном охлаждении, используемом в этом режиме, свободная вода успевает выйти из клетки, и повреждающее действие внутриклеточных кристаллов минимизировано [112]. Однако в этом случае отмечена невысокая

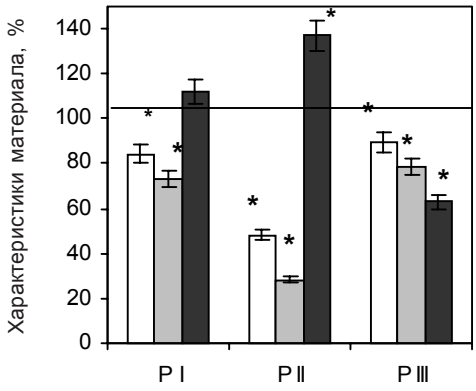


Рис. 16. Изменение показателей ФНК в зависимости от режима криоконсервирования: □ – количество ядерных клеток; ▨ –жизнеспособность; ■ – число адгезивных клеток; * – различия показателей достоверны по сравнению с нФНК после экспозиции с криопротектором, $p < 0,05$.

жизнеспособность деконсервированных ФНК, что может быть также объяснено повреждением мембран клеток вследствие механического напряжения, вызванного избыточной дегидратацией и последующим уменьшением объема клетки до критического размера [2, 3]. Весьма важно, что замораживание согласно режиму РII приводило почти к 50%-му увеличению содержания АК. Такого рода изменения, очевидно, обусловлены перераспределением клеточных субпопуляций в сторону увеличения клеток глии в ФНК на фоне 50%-го снижения содержания клеток в образце после криоконсервирования. Из этого можно сделать вывод о большей криостабильности глиальных клеток по сравнению с нейрональными при реализации медленного замораживания с постоянной скоростью охлаждения [19], что объясняется различной белок-липидной организацией мембран этих клеток [182]. Минимизацию повреждающего действия внутриклеточных кристаллов, формируемых на начальных этапах охлаждения, снятие переохлаждения при температуре кристаллизации и уменьшение вероятности внеклеточного кристаллообразования путем увеличения до максимально возможной скорости замораживания на конечном этапе, обуславливающей безопасную дегидратацию клеток, предусматривал РIII. Действительно, в результате была получена суспензия ФНК с максимальной жизнеспособностью и содержанием клеток (рис. 16). Однако при режиме РIII факторы криоконсервирования обуславливали снижение содержания АК аналогично РII, что, видимо, свидетельствует о модификации клеточной мембраны и шеддинге рецепторов адгезии.

Согласно современным представлениям фетальная нервная ткань в зависимости от срока гестации состоит из нейроэпителиальных клеток, нейро- и глиобластов, малодифференцированных нейронов и глии, которые формируют определенную цитоархитектонику и находятся в специфических межнейрональных и нейроглиальных взаимоотношениях [123, 191]. В связи с этим определение адгезивного потенциала каждой субпопуляции клеток фетального мозга, обеспечиваемого разными типами рецепторов, позволит достаточно полно оценить функциональную активность деконсервированного материала.

Известно, что дифференцировка нервных и глиальных клеток, формирование и рост отростков начинаются только после их прикрепления к какому-либо субстрату [6]. Прикрепление клеток к компонентам внеклеточного матрикса (ламинин, фибронектин, витронектин и др.) осуществляют точечные (фокальные) адгезивные контакты, а прикрепление клеток друг к другу – межклеточные [227].

Адгезивный потенциал глиальных и нейрональных предшественников был оценен в системе *in vitro* при культивировании ФНК в чашках Петри, поверхность которых была покрыта определенной комбинацией белков внеклеточного матрикса. Это способствовало селективному прикреплению к культуральной подложке глиальных и нейрональных элементов за счет их взаимодействия с различными молекулами внеклеточного матрикса. Для прикрепления глиальных клеток использовали покрытие «BioCoat Ламинин/Фибронектин» («BD Pharmingen™», США), для нейрональных элементов – «BioCoat Поли-D-лизин/Ламинин» («BD Pharmingen™», США).

Установлено, что после криоконсервирования ФНК к обработанной полилизином подложке в основном крепились нейрональные клетки, причем при пролонгации срока культивирования

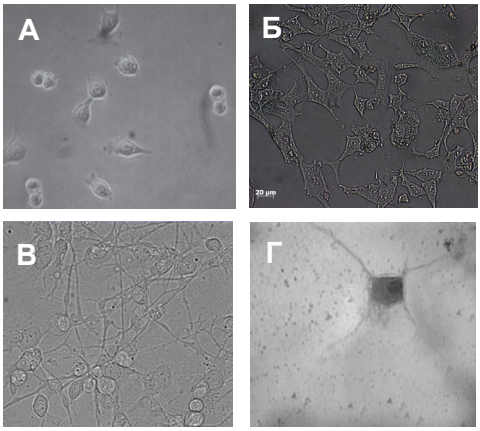


Рис. 17. Этапы дифференцировки нативных ФНК крыс 11 суток гестации *in vitro* с использованием «BioCoat Поли-D-лизин/Ламинин» в качестве субстрата: А – начальные этапы формирования отростков нейронов (24 ч культивирования); Б – распластывание нейронов (3 суток культивирования); В – формирование системы нейропиля (14 суток культивирования); Г – зрелый мультиполярный нейрон в 14-суточной культуре ФНК.

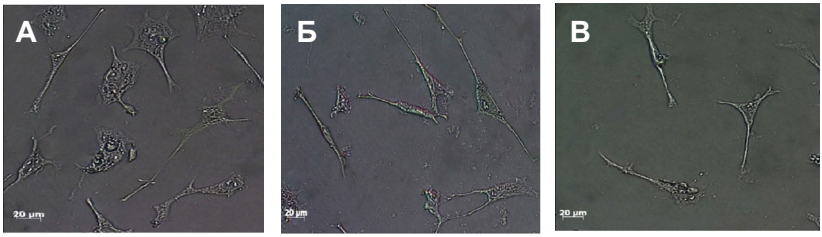


Рис. 18. Адгезия предшественников нейронов к «BioCoat Поли-D-лизин/Ламинин» в культуре ФНК, криоконсервированных по разным режимам: А – PI, Б – PII, В – PIII; 3-и сутки культивирования, окраска по Романовскому-Гимза, ×400.

наблюдали формирование зрелых, морфологически идентифицируемых типов пирамидальных, звездчатых нейронов и развитой системы нейропиля (рис. 17).

Отмечена зависимость интенсивности реализации адгезивного потенциала нейрональных предшественников от режима замораживания-оттаивания. Существенных отличий при культивировании ФНК, криоконсервированных согласно PI, при сравнении с нативным материалом выявлено не было (рис. 18). Снижение адгезивных свойств нейрональных клеток наблюдали после криоконсервирования с использованием PII и особенно PIII. Это может быть связано как с изменением метаболизма ФНК, вызывающего модификацию белок-липидного состава мембран нейрональных клеток, так и криоселекцией* из суспензии тех клеток, которые обусловливают дальнейший процесс нейрогенеза [129].

Известно, что взаимосвязь между нейронами в центральной нервной системе (ЦНС) происходит с помощью нейрональных молекул клеточной адгезии (neural cell adhesion molecule – NCAM), которые относятся к иммуноглобулиновому суперсемейству и осуществляют кальцийнезависимую адгезию [107].

NCAM идентифицированы на плазматических мембранах нейронов и астроглиальных клеток и участвуют в адгезии нейро-

*Криоселекция – количественное перераспределение в сторону увеличения субпопуляций определенных типов клеток в составе гетерогенных суспензий после действия факторов криоконсервирования.

нальных клеток (гомотипическое связывание), а нейроглиальные Ng-CAM, TAG-1, MAG и DCC – нейрональных клеток и клеток глии (гетеротипическое связывание) [107]. Иммуноглобулиноподобные молекулы клеточной адгезии (cell adhesion molecule – CAM) в большей степени участвуют в регуляции адгезивных взаимодействий, а в меньшей – в межклеточном связывании [227]. За эту функцию отвечают кальцийзависимые молекулы – кадхерины. Большинство кадхеринов (E-, N-, P-кадхерины) функционируют в качестве трансмембранных линкерных белков, опосредующих взаимодействия между актиновыми цитоскелетами клеток [206]. Они являются адгезивными белками, вокруг которых формируются межклеточные адгезионные контакты [138]. Эти контакты наиболее ярко представлены в культуре при формировании нейросфер, которые являются гетерогенной популяцией митотически активных, самовосстанавливающихся и мультипотентных клеток в развивающемся фетальном мозге [83, 114]. Получить редкие колонии (нейросферы) нервных стволовых клеток (НСК) в культуре ФНК удалось в бессывороточной среде DMEM:F12 с добавлением эпидермального фактора роста, фактора роста фибробластов, глюкозы и инсулина [170].

Формирование типичных нейросфер наблюдали через 7 суток культивирования нативных ФНК (рис. 19, А, Б); при этом 87,4 ± 1,4% диссоциированных клеток в составе нейросфер окрашивались мо-

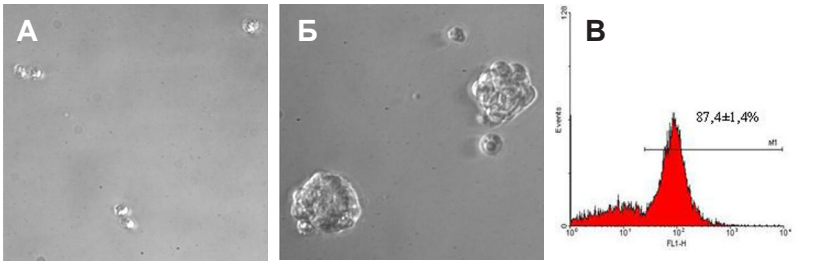


Рис. 19. Характеристики нейросфер в культуре нативных ФНК, 7 суток культивирования, прижизненное фото (А – ×100; Б – ×400), В – количество нестин-положительных клеток в составе нейросфер.

ноклональными антителами к nestin, что доказывает их принадлежность к нервным стволовым/прогениторным клеткам (рис. 19, В).

При смене условий культивирования и перенесении нейросфер в среду, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), наблюдали их уплощение, прикрепление к полилизиновому субстрату, а также разрыхление центральной зоны нейросферы и миграцию нейрональных предшественников по периферии (рис. 20).

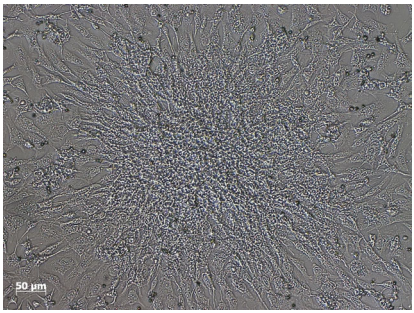


Рис. 20. Прикрепление нейросфер в среде с добавлением 10% FBS, 14 суток культивирования, прижизненное фото.

Криоконсервирование приводило к некоторой временной задержке образования нейросфер (в среднем на 2 суток), причем этот показатель не зависел от режима замораживания. Количество сформированных нейросфер на 9-е сутки культивирования определялось режимом замораживания и было максимальным в культуре ФНК, криоконсервированных с использованием РIII (рис. 21).

Таким образом, различные режимы замораживания в различной степени модифицируют экспансию молекул адгезии на ФНК – от стимуляции до ингибирования. Учитывая центральную роль адге-

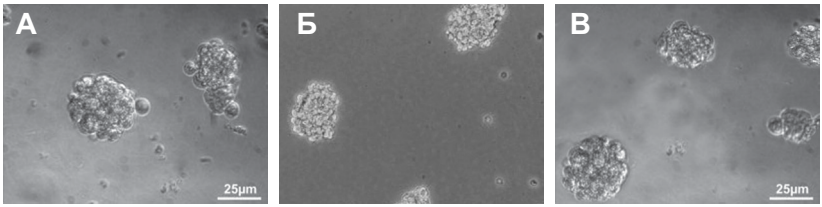


Рис. 21. Формирование нейросфер в культуре ФНК, криоконсервированных по разным режимам: А – РI; Б – РII; В – РIII; 9 суток культивирования, прижизненное фото.

зивных молекул ФНК в коммуникационных взаимодействиях [197, 206], можно предположить, что криоконсервирование существенно изменяет функциональный потенциал этих клеток. В связи с этим была оценена функциональная активность ФНК после криоконсервирования.

Считается, что в результате криоконсервирования можно получить материал с заданными свойствами для решения необходимых экспериментальных задач и лечения конкретных патологий. В наших работах [15, 19, 129] были получены убедительные данные, касающиеся селективного влияния определенных режимов криоконсервирования на субпопуляционный состав ФНК.

Каждый тип клеток имеет особый спектр цитоскелетных белков, присутствующих в определенном соотношении на различных стадиях развития и имеющих специфическое расположение [227]. Известно, что рецепторы клеток имеют вне- и внутриклеточный домен, который осуществляет структурную связь между внеклеточным матриксом и цитоскелетом клетки. При этом изменение структуры элементов цитоскелета может приводить к значительным нарушениям рецепторного аппарата и функции клеток [194]. Предполагают, что характер взаимодействия рецепторного аппарата с элементами цитоскелета клетки может изменяться в процессе криоконсервирования [160]. Поэтому изучение фенотипических характеристик ФНК особенно важно для понимания механизмов влияния замораживания-оттаивания.

Фетальная нервная ткань в зависимости от срока гестации состоит из нервных стволовых клеток (НСК), нейро- и глиобластов, малодифференцированных нейронов и глии, которые формируют определенную цитоархитектонику и находятся в специфических межнейрональных и нейроглиальных взаимоотношениях (рис. 22). НСК сохраняют основное свойство стволовых клеток – способность к нелимитированному самообновлению и являются прародителями всех нервных, глиальных и эпендимальных клеток нервной системы [88].

Субпопуляционный состав ФНК наиболее полно можно оценить цитофлуориметрически с использованием панели моноклональных антител, специфичных к структурам прогениторных нейроклеток, глиальных и нейрональных предшественников. К НСК относят

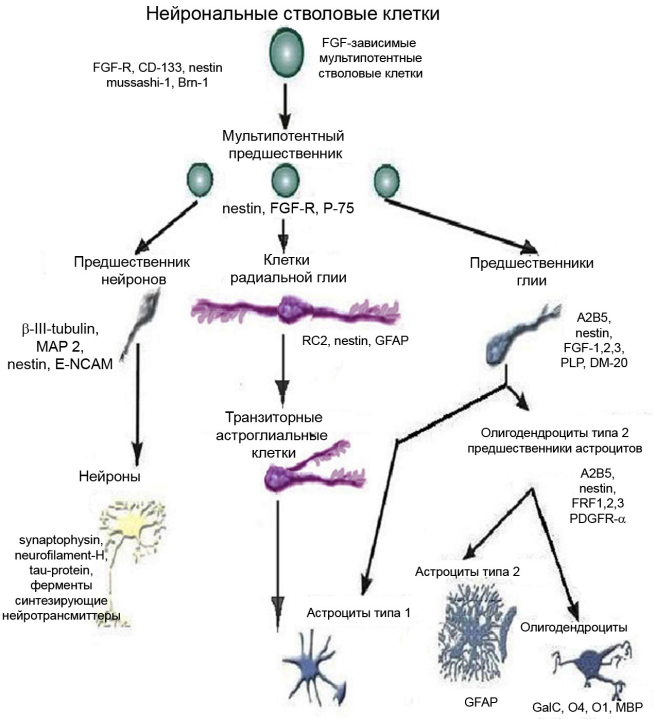


Рис. 22. Схема дифференцировки клеток ЦНС [123].

клетки с фенотипом CD133 (или проминин), nestin, SOX-2 [123]. CD133 экспрессируется плюрипотентными стволовыми клетками, являющимися эндотелиальными прогениторами, способными к дифференцировке в нейроны, астроциты или олигодендроциты [146].

При этом дифференцировка НСК сопровождается повышением экспрессии специфичных генов и, соответственно, появлением в клетке таких белков цитоскелета, как nestin, β-тубулин, глиальный кислый фибриллярный белок (glial fibrillary acidic protein – GFAP), белок, взаимодействующий с микротрубочками MAP2 (microtubule-associated protein 2), и некоторых других маркеров [145].

Важнейшими компонентами цитоскелета являются промежуточные филаменты. Они создают внутриклеточный каркас, обеспечивают упругость клетки, поддерживают упорядоченность расположения компонентов цитоплазмы, координируют связи между внеклеточным матриксом, цитоплазмой и ядром.

Промежуточные филаменты цитоскелета – специфические маркеры уровня тканевой и клеточной дифференцировки [84]. Nestin, являясь одним из стадиоспецифических белков цитоскелета нейроэпителиальных СК, рассматривается как маркер мультипотентных прогениторов, постмитотических нейронов, ранних нейробластов [126]. Показано, что по мере дифференцировки нервной ткани синтез nestin подавляется [175], и в дифференцирующихся астроцитах и нейронах начинают экспрессироваться GFAP и β-tubulin соответственно [216]. GFAP – специфический маркер астроцитов, который участвует в формировании глиальных филаментов и молекулярных механизмах нейрон-астроцитарных взаимодействий [110, 169]. β-tubulin имеет семь изоформ и является самым ранним из известных маркеров нейрональной дифференцировки [137].

Важным компонентом анализа состояния ФНК методом проточной цитофлуориметрии считают оценку интенсивности флуоресценции того или иного маркера с использованием показателя «средней интенсивности флуоресценции» (СИФ), который отражает плотность присутствия антигенов, выраженную в условных единицах (у. е.) и является объективным показателем структурно-функционального состояния клеток. Ранее было установлено, что изменение плотности рецепторных структур на клетке переводит ее в новое функциональное состояние [34]. Показано, что криоконсервирование оказывало существенное влияние как на субпопуляционный состав ФНК, так и на степень экспрессии того или иного маркера в субпопуляциях с определенными фенотипами, судя по изменению СИФ.

Как видно из рис. 23, после криоконсервирования по PI сохранность ФНК изменялась в наименьшей степени по сравнению с нативным контролем и имела тенденцию к обогащению $CD133^+$- и $nestin^+$-клетками, относящимися к мультипотентным стволовым предшественникам.

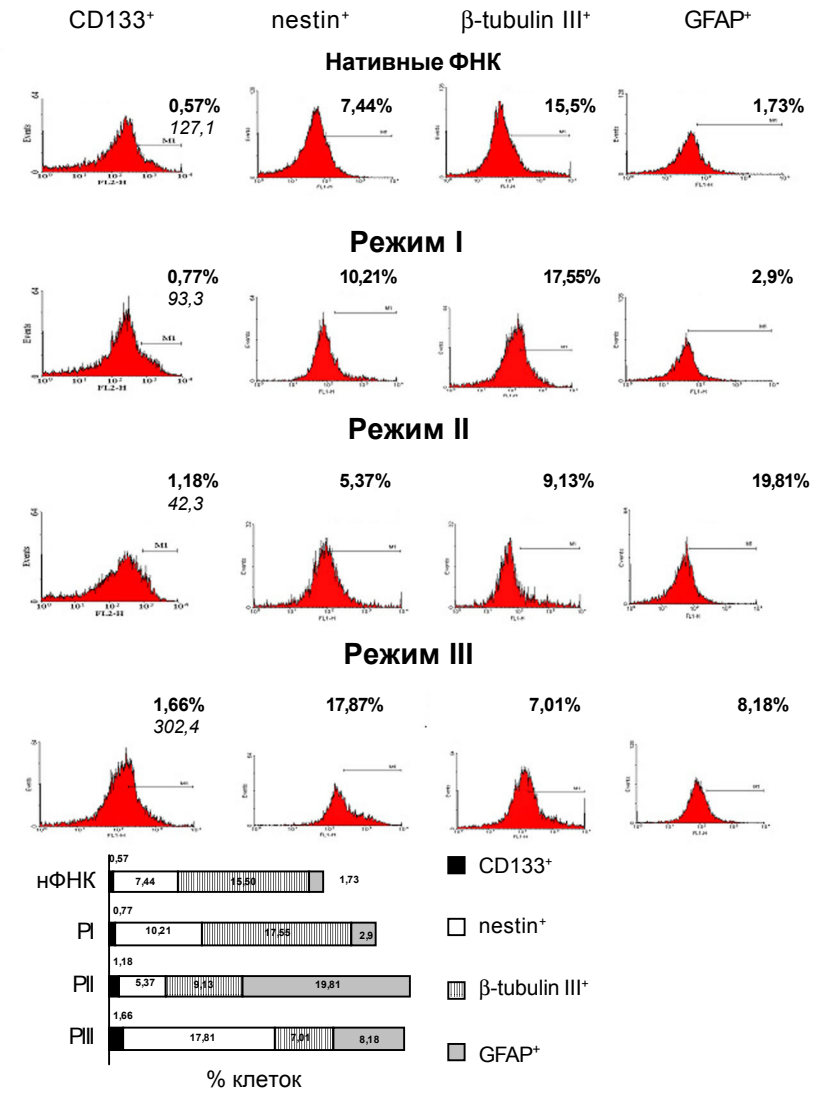


Рис. 23. Иммунофенотип нативных и криоконсервированных по разным режимам ФНК 11 суток гестации. На гистограммах указано содержание клеток в общей популяции в процентах (жирным шрифтом) и соответствующая СИФ в условных единицах (курсив).

Режим II проявлял определенную «агрессивность» по отношению к предшественникам нейронов, судя по значительному снижению количества β-tubulin$^+$-клеток (рис. 23). Интересно, что при культивировании такого материала количество клеток, прикрепляющихся к «BioCoat Поли-D-лизин/Ламинин», также значительно снижалось. При этом относительное количество глиальных элементов, судя по количеству GFAP$^+$-клеток, напротив, существенно возрастало, что согласуется с данными, полученными при анализе адгезивной фракции клеток фетального мозга по методу «преплейтинга» [19]. Очевидно, что в данном случае мы имеем дело с перераспределением клеточных популяций ФНК за счет большей криоустойчивости более дифференцированных элементов [58].

Важно отметить, что PIII обеспечивал преимущественную сохранность субпопуляций, относящихся к элементам с мультипотентным дифференцировочным потенциалом. Так, количество CD133$^+$-клеток увеличилось в 3 раза с одновременным повышением в 2,4 раза содержания nestin$^+$-клеток по сравнению с аналогичными показателями у нативных ФНК. При этом клетки стволового компартмента имели и более высокую степень экспрессии маркеров CD133 и nestin (увеличение СИФ в 2,5 по сравнению с нФНК). Такого рода изменения обусловлены особенностями структурной организации прогениторных клеток, которые проявляют при использовании определенных режимов криоконсервирования большую криоустойчивость по сравнению с другими элементами. Интересно, что PIII способствовал значительной гибели клеток, дифференцированных в нейрональном направлении, судя по снижению содержания клеток, экспрессирующих β-tubulin. Основой таких изменений может быть осмотический и термальный шок, которому подвергаются клетки в процессе криоконсервирования и который сопровождается шеддингом, агрегацией или интернализацией мембранных и внутриклеточных структур клеток [143]. В итоге это приводит к нарушению интегральной функциональной активности ФНК [14, 19] путем изменения их способность взаимодействовать с микроокружением, а именно, восприятия его регуляторных сигналов, и, как следствие, к нарушению состояния каскадов транскрипционного и трансляционного уровней [194].

Таким образом установлен факт возможности использования определенного режима криоконсервирования (РІІІ) как способа обогащения пула ФНК стволовыми клетками. Данный эффект важен в плане получения биоматериала с определенным функциональным потенциалом с целью дальнейшего терапевтического использования ряда таких патологий нервной системы, как инсульт, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, рассеянный склероз и травматические повреждения спинного мозга [65] и др. Терапевтическая ценность прогениторных клеток ФНК обусловлена их мощным гистогенетическим потенциалом, реализуемым в процессе реставрации поврежденных мозговых структур реципиента, а также способностью проявлять пара- и эндокринную активность в местах своей локализации [156, 224]. Именно они могут достигать органа-мишени и дифференцироваться в определенном направлении, а также реконструировать трехмерную архитектуру мозга, увеличивая число полноценно функционирующих клеток [141]. В связи с этим полученные нами данные вносят существенный вклад в разработку и оптимизацию такого рода терапии вышеперечисленных заболеваний, в том числе с применением кФНК [188].

Таким образом, мы рассмотрели влияние режимов криоконсервирования на популяционный состав различных видов биоматериала (КМ, КФП, ФНК) с целью обоснования их дальнейшего применения в терапии АИЗ. Показано, что для сохранения после криоконсервирования структуры и функции клеток стволового компартмента (СКК и МСК) из разных источников (КМ, ФП) принципиально важна их морфофункциональная сохранность, зависящая от уровня их дифференцировки, которая определяется экспрессией тех или иных мембранных маркеров и находится под контролем генов, ответственных за гемо- и иммуномодулирующую активность. Выявлены значительные отличия чувствительности СК из разных источников к криоконсервированию, в частности по наиболее значимому – колониеобразующему потенциалу. Установлен факт некоторого несоответствия гиперэкспрессии маркеров, характерных для СК, и проявления их функциональной активности, т. е., по экспрессии определенных рецепторов нельзя однозначно судить о сохранении функционального потенциала исследуемых клеток.

Установлено, что КФП разного срока гестации имеют различные структурно-функциональные характеристики, что, безусловно, определяет их криолабильность/криостабильность. В частности впервые показано, что в криоконсервированных КФП поздних сроков гестации значительно повышались содержание СКК и уровень экспрессии в них гена *gata2*, ответственного за гемопоэтическую активность, и *ido* – за иммуномодулирующую активность МСК. Данный факт может быть предпосылкой возможного применения СК как основного компонента препаратов клеточной и тканевой терапии при лечении экспериментальных АИЗ.

Проанализировано влияние различных режимов замораживания на функциональный потенциал другого представителя ПФПК – ФНК. Доказано селективное действие определенных режимов замораживания на субпопуляционный состав ФНК. Установлено, что при использовании PI сохранялся функциональный потенциал кФНК, подобный нативному материалу; PII способствовал обогащению популяции фетального мозга глиальными элементами. Особую значимость имеет факт обогащения пула ФНК стволовоклеточными элементами после их криоконсервирования с использованием PIII за счет гибели более дифференцированных предшественников нейронов.

Результаты исследований позволяют выделить как минимум два фактора, определяющих криолабильность либо криостабильность биообъекта: их исходное морфофункциональное состояние и условия криоконсервирования (режимы замораживания). Обобщены данные, подтверждающие селективное влияние определенных режимов криоконсервирования на гетерогенный состав клеточных суспензий. Итак, можно считать установленным факт большей криостабильности стволовоклеточных элементов в гетерогенном составе биоматериала. Намечены перспективы управления терапевти-ческим потенциалом ПФПК, применяемых для лечения различных форм АИЗ с помощью криоконсервирования. Далее представлены результаты оценки терапевтической активности ПФПК, криоконсервированных с использованием различных режимов замораживания, на экспериментальных моделях заболеваний аутоиммунного генеза.

2. Экспериментальное обоснование возможности применения криоконсервированных стволовых клеток как основного составного компонента препаратов клеточной и тканевой терапии

2.1. Применение клеток фетальной печени при лечении патологий с признаками аутоиммунных заболеваний

Клетки фетальной печени являются важным компонентом широко используемой в настоящее время клеточной и тканевой терапии [18, 22, 28, 127]. Эффективность их применения подтверждена результатами лечения многих патологий, в том числе и АИЗ. При данном виде заболеваний необходима коррекция состояния гемопоэза и иммунного статуса [12, 20, 33]. В гетерогенной популяции КФП основными компонентами с такого рода корригирующей активностью являются СКК и МСК. Важно, что МСК, даже в малой концентрации в общем пуле КФП, способны реализовать иммуносупрессивный эффект в отношении клеток индукторов (эффекторов) развития АИЗ за счет продукции таких цитокинов, как ТРФ-β, простагландин Е2, ИЛ-2, ИЛ-10 и др. Кроме того, механизм иммуносупрессии реализуется также через индукцию в МСК экспрессии триптофан-катаболизирующего фермента ИДО с образованием L-кинуренина, пиколиновой и квинолиновой кислот [174]. Супрессивный эффект этих катаболитов триптофана распространяется в основном на активированные и пролиферирующие иммунокомпетентные клетки (ИКК).

По мере пролонгации сроков гестации изменяются структурно-функциональные характеристики клеток стволового компартмента КФП: репертуар и степень экспрессии фенотипических маркеров [23, 109, 125], репопуляционный потенциал, спектр продуцируемых медиаторов [76, 81] и т. д. Другими словами, очевидны отличия структурно-функционального состояния КФП разных сроков гестации. При этом известно, что характер влияния криоконсервирования на биообъект определяется исходным статусом биообъекта [20, 69, 81]. Очевидно, например, что основные элементы ФП (кроветворные предшественники, стромальные элементы и т. д.) имеют различную криолабильность в зависимости от сроков гестации, что может изменять их терапевтический потенциал.

Рассмотрим способность нативных и криоконсервированных клеток ФП корригировать состояние гемопоэтической и иммунной систем организма при АИЗ.

2.1.1. Лечение адъювантного артрита клетками фетальной печени

Ревматоидный артрит (РА), экспериментальной моделью которого является адъювантный артрит (АА), представляет собой наиболее «жесткое» и распространенное аутоиммунное заболевание человека. У животных АА моделируется введением полного адъюванта Фрейнда, основным признаком развития которого у грызунов является отек конечности, региональной к месту введения [89]. Степень отека оценивали по отношению диаметра опытного голеностопного сустава к интактному выражали в виде индекса артрита (ИА). Исследуемые животные были разделены на следующие группы: 1 – интактные (контроль); 2 – с АА; 3 с АА после введения нКФП-14; 4 – с АА после введения нКФП-18; 5 – с АА после введения кКФП-14; 6 – с АА после введения кКФП-18. Из рис. 24 видно, что этот показатель по мере развития АА (с 1 по 28 сутки) имел волнообразный характер (у интактных животных ИА принят за единицу). Нативные и криоконсервированные КФП вводили на 7-е сутки патологии, минуя острую фазу воспалительного процесса при АА. Криоконсервирование КФП разных сроков гестации осуществляли с использованием 10% ДМСО и скорости охлаждения 1 град/мин до –25°С с последующим погружением в жид-

Рис. 24. ИА у животных до и после введения КФП на 7-е сутки после индукции АА: ◆ – АА; □ – АА + нКФП-14; ■ – АА + нКФП-18; ○ – АА + кКФП-14; ● – АА+кКФП-18.

кий азот [23]. Показано, что, судя по изменению ИА, корригирующее действие оказывали кКФП-14 и нКФП-18 (рис. 24).

H.A. Papadaki с соавт. [186] указывают, что РА является системным заболеванием, S. Hirohata акцентирует особое внимание на расбалансировке гемопоэза при РА [144] и необходимости поиска эффективных методов ее коррекции.

Представленные на рис. 25 и 26 результаты свидетельствуют о проявлении гемопоэзкорригирующего потенциала КФП в зависимости от вида вводимого материала и срока оценки его эффекта. Так, показатели костномозгового гемопоэза принципиально отличались через 7 и 14 суток после введения КФП. Важным является выраженная стимуляция пролиферации миелокариоцитов уже через 7 суток после введения нКФП-18, что подтверждает наличие в КФП поздних сроков гестации пула более дифференцированных кроветворных элементов. Криоконсервированные КФП этого же срока гестации не проявляли такого эффекта. По-видимому, криоконсервирование оказывает ингибирующее влияние в отношении

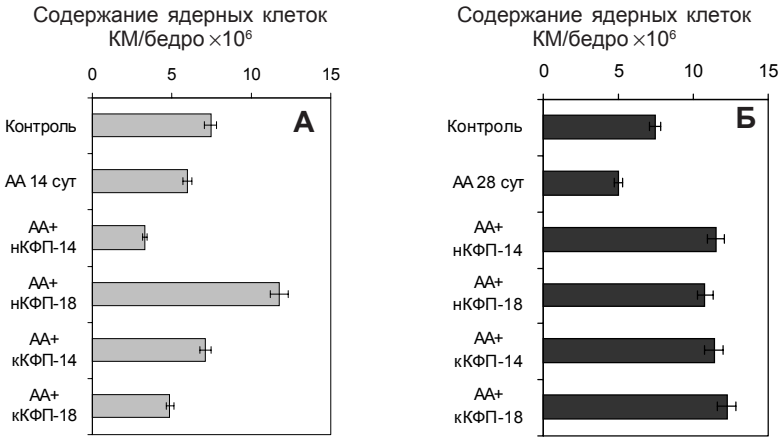


Рис. 25. Содержание ядерных клеток КМ/бедро $\times 10^6$ у животных с АА после введения КФП: А –- на 7-е сутки (14-е сутки развития АА); Б – на 21-е сутки (28-е сутки развития АА).

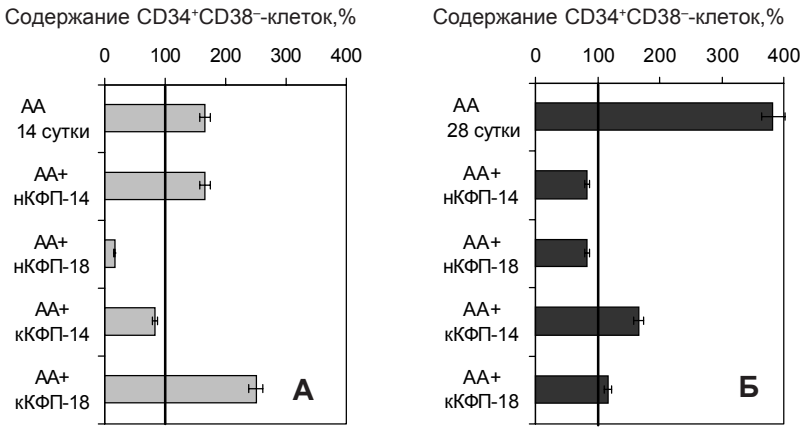


Рис. 26. Содержание $CD34^+CD38^-$-клеток в КМ животных с АА после введения КФП; А — на 7-е сутки (14-е сутки развития АА); Б – на 21-е сутки (28-е сутки развития АА); за 100% принят показатель, соответствующий интактному контролю.

СКК как ФП [23], так и взрослого КМ [130]. При этом важно, что гемопоэзстимулирующая активность кКФП-18 снижается на фоне перераспределения в сторону увеличения в них СКК, что было показано в предыдущих исследованиях. Однако через 14 суток оба вида вводимых КФП стимулировали медуллярное кроветворение (рис. 25).

Гемопоэзкорригирующий потенциал КФП, безусловно, связан с присутствием в общем ее пуле СКК, которые, как и другие донорские клетки (МСК и т. д.), способны регулировать СКК реципиента [132]. В связи с этим представляло интерес определить в КМ леченых животных содержание клеток с фенотипическими признаками СКК разного уровня коммитированности, а именно клеток $CD34^+CD38^-$ и $CD117^+$ [36]. Как видно из рис. 26, при развитии АА (с 14-х по 28-е сутки) в КМ содержание обеих субпопуляций СКК увеличивалось по сравнению с контролем (исследуемый показатель у здоровых животных). То есть, при развитии патологии каждая из указанных субпопуляций кроветворных

предшественников переходит в состояние функционального «овершута»* , что, по мнению многих исследователей, является следствием выраженного изменения цитокинового профиля при АИЗ [82, 158].

Более того, концентрация $CD34^+CD38^-$-клеток повышалась по мере развития патологии на фоне сниженного содержания миелокариоцитов. Возможно, что в данном случае реализовался потенциал самовоспроизведения $CD34^+CD38^-$-клеток, но не дифференцировки. Тот же характер поведения при АА был отмечен и у субпопуляции СКК с фенотипом $CD117^+$ (рис. 27).

Введение нКФП и кКФП в разной степени влияло на содержание $CD34^+CD38^-$-клеток в КМ в разные сутки развития АА. Так, через 7 суток данный показатель приближался к норме только после введения кКФП-14 (см. рис. 26, А), при этом нормализовалось и содержание миелокариоцитов (см. рис. 25, А). Парадоксальным оказалось разнонаправленное действие нативных и криоконсервированных КФП-18, что, по-видимому, связано с существенным изменением компонентного состава вводимого материала.

Важно, что в более поздние сроки наблюдения (21-е сутки после введения КФП) различия в корригирующем эффекте всех видов КФП в отношении пула более потентных СКК практически нивелировались (см. рис. 26, Б).

Несколько иной модулирующий потенциал проявляли КФП в отношении популяции $CD117^+$-клеток (рис. 27). Все виды вводимого материала в разной степени вызывали увеличение содержания этих клеток в КМ животных с АА. На 7-е сутки только после введения нКФП-18 количество $CD117^+$-клеток не отличалось от такового у животных с АА (рис. 27, А). Выше контроля осталось содержание $CD117^+$-клеток во всех группах и на 21-е сутки после введения КФП (рис. 27, Б), хотя в этом случае максимально выраженный корригирующий эффект проявляли кКФП-14 и нКФП-18.

Фенотипические и функциональные характеристики клеток-предшественников гемопоэтических тканей реципиента также определяются уровнем экспрессии соответствующих генов. Для

*«Овершут» (от англ. overshoot) – дословно «выброс», т. е. наибольшее увеличение исследуемого показателя от контрольного значения.

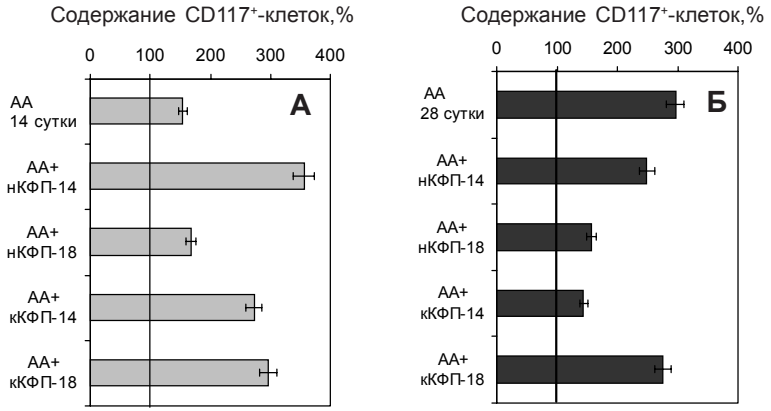


Рис. 27. Содержание $CD117^+$-клеток в КМ животных с АА после введения КПФ; А – на 7-е сутки (14-е сутки развития АА); Б – на 21-е сутки (28-е сутки развития АА); за 100% принят показатель, соответствующий интактному контролю.

проявления активности СКК особою роль играют такие гены, как *gata2* и *c-kit* [81, 184, 212, 234]. Активация экспрессии этих генов была отмечена уже на 14-е сутки развития АА (рис. 28, 29), хотя и не в полной мере, но совпадала с повышением содержания клеток $CD34^+CD38^-$ и $CD117^+$ в КМ нелеченых животных (см. рис. 26, 27).

Следует отметить, что ни один из видов КФП не нормализовал уровень экспрессии генов *gata2* и *c-kit* через 7 суток после введения. Более того, оба гена, находились в состоянии гиперактивности. Исключение составляла группа животных с введением нКФП-18, у которых экспрессия гена *gata2* была снижена более чем в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 28). У животных этой группы было снижено в этот срок и содержание $CD34^+CD38^-$-клеток (см. рис. 26, А). Однако к концу срока наблюдения только в этой группе показатель экспрессии гена *gata2* нормализовался. Что касается гена *c-kit* (рис. 29), то уровень его экспрессии на 28-е сутки максимально приближался к контролю после введения нКФП-18 и кКФП-14 и соответствовал динамике изменения содержания $CD117^+$-клеток (см. рис. 27).

Таким образом, как нативные, так и криоконсервированные КФП проявляют модулирующую активность в отношении исследуемых показателей. Кроме того, криоконсервирование существенно изменяет корригирующую активность КФП в зависимости от срока гестации. Установлено отсутствие синхронизированного изменения показателей в той или иной группе, в первую очередь содержания исследуемых субпопуляций СКК и экспрессии генов, причастных к их функциональной активности. По-видимому, не только гены *gata2* и *c-kit* играют роль в процессе функционирования СКК [81, 184]. Более того, поскольку известно, что развитие АА сопровождается разбалансировкой состояния не столько гемопоэтического плацдарма, сколько иммунной системы, определяющей состояние вышеуказанных показателей гемопоэза, особую значимость имеет моноцитарно-фагоцитарная система (МФС) реципиентов. Она *a priori* определяет характер изменения цитокинового профиля

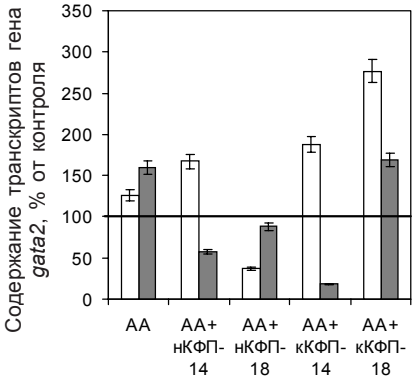


Рис. 28. Содержание транскриптов гена *gata2* в КМ животных с АА на 7-е (□, 14-е сутки развития АА) и 21-е (■, 28-е сутки развития АА) сутки после введения КФП; за 100% принят показатель, соответствующий интактному контролю.

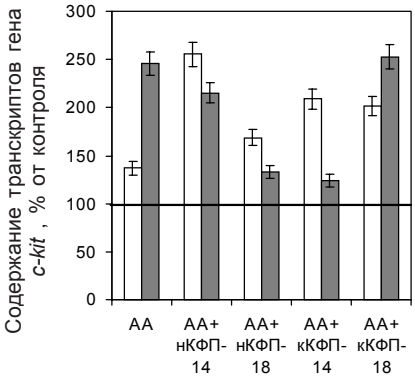


Рис. 29. Содержание транскриптов гена *c-kit* в КМ животных с АА на 7-е (□, 14-е сутки развития АА) и 21-е (■, 28-е сутки развития АА) сутки после введения КФП; за 100% принят показатель, соответствующий интактному контролю.

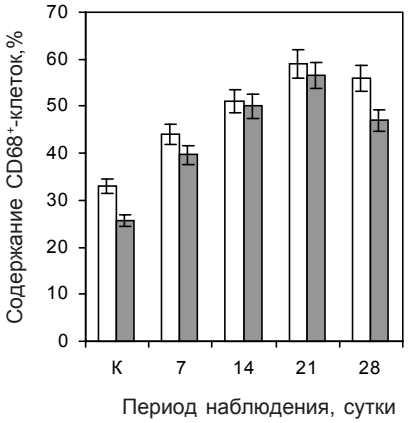


Рис. 30. Содержание CD68$^+$-клеток (■) среди адгезивных клеток (□) перитонеальной полости на разных стадиях развития АА; К – контроль.

при АИЗ [158] и ее коррекция при этих патологиях крайне необходима.

Известно, что ИКК, включая клетки МФС, при АИЗ «ускользают» от апоптоза [154, 172]. Результаты наших предыдущих экспериментальных исследований доказали возможность препаратами плаценты активировать апоптоз клеток иммунной системы у животных с АА с целью нормализации их клинического статуса [18]. Вместе с тем механизм реализации такой активности до конца не изучен. В связи с этим нами была проведена оценка влияния КФП, а именно нКФП-14 и кКФП-14, на апоптозиндуцибельный потенциал клеток МФС (перитонеальных макрофагов).

Результаты исследований показали (рис. 30), что в перитонеальной полости (ПП) интактных мышей содержится около 33% клеток с адгезивным потенциалом. По данным цитофлуориметрического анализа установлено, что около 80% этих клеток экспрессировало CD68-структуру, характеризуемую как маркер моноцитов и макрофагов.

Развитие АА сопровождалось изменением в ПП как общего содержания клеток, так и клеток с маркерами МФС (табл. 1). После лечения глюкокортикоидами (ГК) (группы 6–9) количество погибших клеток ПП (меченых пропидий йодидом) значительно увеличивалось. Этот показатель повышался и после введения КФП в зависимости от срока введения и вида материала. Максимальная гибель клеток наблюдалась после введения кКФП на 7 сутки развития АА, однако уже к 14 суткам (группы 12 и 16) этот показатель достоверно снижался (табл. 1).

Таблица 1. Процентное содержание погибших клеток МФС

Группы животных			Номер группы[&]	Содержание погибших клеток МФС, %
Интактные (контроль)			1	1,97 ± 0,03
АА	Нелеченые	АА 7 суток	2	4,4 ± 0,2
		АА 14 суток	3	3,1 ± 0,1
		АА 21 суток	4	4,52 ± 0,46
		АА 28 суток	5	5,2 ± 0,5
	Леченые глюкокортикоидами (дексаметозон)	АА 7 суток + ГК (через 1 неделю после введения)	6	18,6 ± 0,8*
		АА 7 суток + ГК (через 2 недели после введения)	7	17,9 ± 0,6*
		АА 14 суток + ГК (через 1 неделю после введения)	8	16,8 ± 0,19*
		АА 14 суток + ГК (через 2 недели после введения)	9	16,4 ± 0,11*
	Леченые кКФП	АА 7 суток + кКФП (через 1 неделю после введения)	10	9,5 ± 0,05*#
		АА 7 суток + кКФП (через 2 недели после введения)	11	6,1 ± 0,1*#
		АА 14 суток + кКФП (через 1 неделю после введения)	12	7,9 ± 0,05*#
		АА 14 суток + кКФП (через 2 недели после введения)	13	8,1 ± 0,1*#
	Леченые нКФП	АА 7суток + нКФП (через 1 неделю после введения)	14	8,6 ± 0,3*#
		АА 7суток + нКФП (через 2 недели после введения)	15	7,4 ± 0,08*#
		АА 14 суток + нКФП (через 1 неделю после введения)	16	7,5 ± 0,5*#
		АА 14 суток + нКФП (через 2 недели после введения)	17	5,75 ± 0,25*#

Примечание: различия достоверны при ($p < 0,05$) по сравнению с: * – нелеченными животными; # – между группами животных, леченых кКФП и нКФП; & – номера групп, используемые на рис. 31–33.

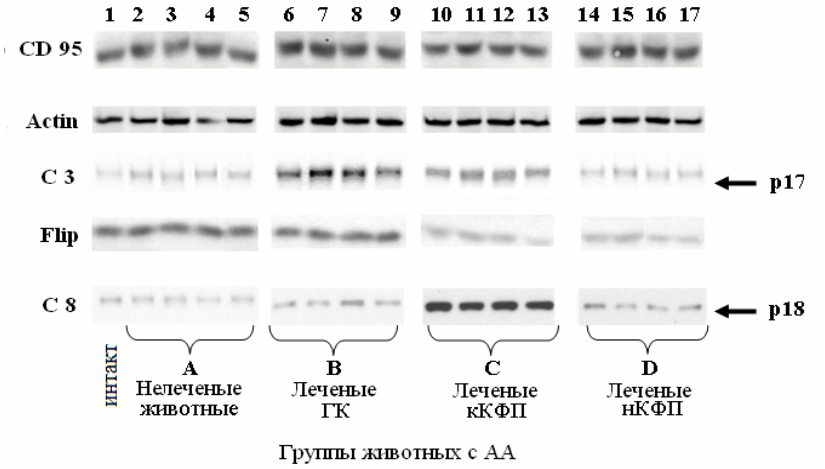


Рис. 31. Анализ экспрессии белков каскада CD95. Вестерн-блот анализ против CD95, каспазы-3(C3), FLIP, каспазы-8 (C8) был проведен на лизатах клеток МФС (p17 – продукт протеолиза каспазы-3; p18 – продукт протеолиза каспазы-8). Вестерн-блот против актина был проведен в качестве контроля количества тотального белка в образце. Нумерация групп животных приведена в табл. 1.

Применение ГК вызывает апоптоз клеток МФС [59]. Ключевыми ферментами апоптогенных сигналов являются каспазы [67].

Классическим показателем индукции апоптоза является активация каспазы-3 [67], сопровождающаяся появлением белка p17 как продукта ее каталитической активности. Как видно из рис. 31, белок p17 присутствовал в лизатах клеток МФС всех исследуемых групп животных, кроме интактной (группа 1).

Для количественной оценки каталитической активности данного фермента в разных экспериментальных группах был использован флуорогенный метод DEVD-AMC. Наиболее выраженная активность каспазы-3 (рис. 32) наблюдалась в группах животных, леченых ГК, с максимальным значением в группе 7 (через 2 недели после введения ГК– на 7 сутки АА).

Высокий уровень активности каспазы-3 также был отмечен в группах животных, которым вводили кКФП. При этом макси-

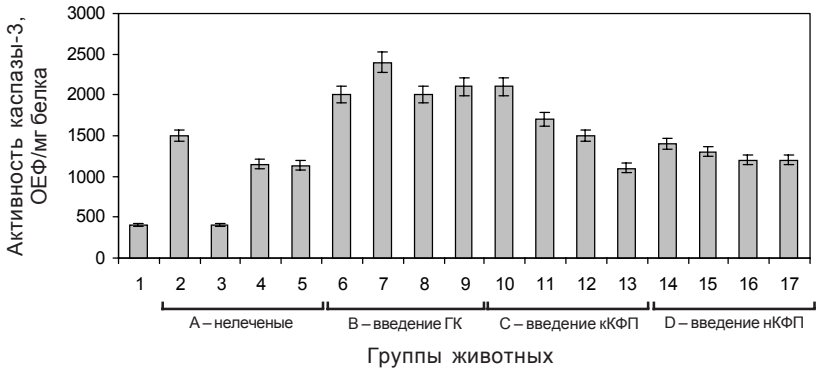


Рис. 32. Анализ активности каспазы-3. Нумерация групп животных приведена в табл. 1.

мальный результат, сравнимый по эффективности с ГК, также наблюдался при введении кКФП на 7-е сутки развития АА, однако реализовывался уже через неделю после их введения (рис. 32, группа 10, С). Положительный эффект вводимых кКФП в данный период развития патологии (АА 7-е сутки) сохранялся на протяжении двух недель после лечения. Введение кКФП на 14-е сутки АА (группа 12, С) в меньшей степени активировало каспазу-3. Важно отметить, что нКФП имели примерно одинаковый эффект вне зависимости от срока введения, который однако существенно уступал кКФП.

Индуцибельный эффект КФП в отношении каспазы-3 может реализовываться через активацию играющих ведущую роль в стимуляции апоптоза таких мембранных «рецепторов смерти», как CD95, входящих в суперсемейство факторов некроза опухоли. Известно, что в отличие от нейтрофилов, макрофаги устойчивы к CD95/CD95L-опосредованному апоптозу [193], что обусловлено повышенной внутриклеточной экспрессией у них ингибитора апоптоза c-FLIP (caspase 8 homologue FLICE – inhibitory protein). Так, наблюдаемое снижение индекса апоптоза в моноцитах и макрофагах ПП при АА, согласно ранее полученным нами данным [61], может быть связано с повышением экспрессии ингибитора апоп-

тоза белка FLIP и экспрессии гена *bcl-2*. Установлено [53], что «ускользание» макрофагов от апоптоза может определяться особенностями секреторной активности и их востребованностью в реализации иммуновоспалительных реакций.

На рис. 31 видно, что клетки МФС во всех исследуемых группах имели высокий и примерно одинаковый уровень экспрессии CD95-структуры, что свидетельствует об их готовности к апоптозу. В связи с вышеизложенным, не удивителен был и установленный факт высокого уровня экспрессии FLIP белков у животных с АА, что соответствовало самому низкому проценту погибших клеток. Однако у животных после лечения ГК также был отмечен высокий уровень экспрессии FLIP. При этом весьма важно, что уровень экспрессии этого же белка у животных после введения КФП был значительно ниже. Данный факт подтверждает способность вводимых КФП регулировать в клетках МФС животных с АА как про- так и антиапоптотические каскады. Как видно из рис. 31, в группах С и D такого рода активность присуща именно КФП, так как после применения ГК подобного эффекта не наблюдалось (см. рис. 31, группа В).

Продуцируемые КФП регуляторные медиаторы могут проявлять при лечении АИЗ многовекторное действие, определяемое уровнем экспансии иммуновоспалительного процесса в организме [18]. Другими словами, регуляторная активность введенных КФП – это ответ на «запрос ситуации», в которую они попадают [28]. Как отмечалось выше, имея *a priori* различный исходный статус перед введением реципиенту, нативные и криоконсервированные КФП могут по-разному «отвечать» на сложившуюся на данный момент в организме ситуацию. Подтверждением этому является установленный нами факт продукции FLIP. Как известно, FLIP играет дуалистическую роль в апоптотическом каскаде и может быть как ингибитором, так и индуктором апоптоза, активируя каспазу-8 [96, 128]. Проведенный анализ активации каспазы-8 (см. рис. 8) по присутствию и квантификации продуктов протеолиза, а именно p18, выявил тенденцию повышения их содержания после введения кКФП. С целью установления более точных различий его содержания в клетках МФС разных групп животных был использован метод определения каталитической активности кас-

пазы-8, заключающийся в измерении протеолитического расщепления флуорогенных субстратов: ZIETD-AFC и AC-DEVD-AMC. Действительно, были установлены различия исследуемого показателя в группах животных после лечения нативными и криоконсервированными КФП. Так, наиболее выраженная активация каспазы-8 была отмечена при введении кКФП на 7-е и 14-е сутки развития АА с максимальной выраженностью в обоих случаях через 2 недели после введения (рис. 33, группы 11 и 13, C).

Подобный эффект наблюдали и после введения нКФП (рис. 33, группа D), но в 2 раза меньше, чем у кКФП, что очередной раз подтверждает значимость влияния криоконсервирования на функциональный статус биообъекта.

Очевидно, что различия в проявлении как апоптоз-, так и антиапоптозиндуцибельной активности кКФП в отношении клеток МФС по сравнению с нКФП могут быть обусловлены изменением после криоконсервирования количественного состава различных медиатор-продуцирующих клеток в гетерогенной популяции КФП. Нельзя не учитывать, что в процессе криоконсервирования может изменяться уровень экспрессии определенных генов в КФП, отвечающих за продукцию регуляторных медиаторов, причастных к активации ингибиции апоптотических процессов в клетках.

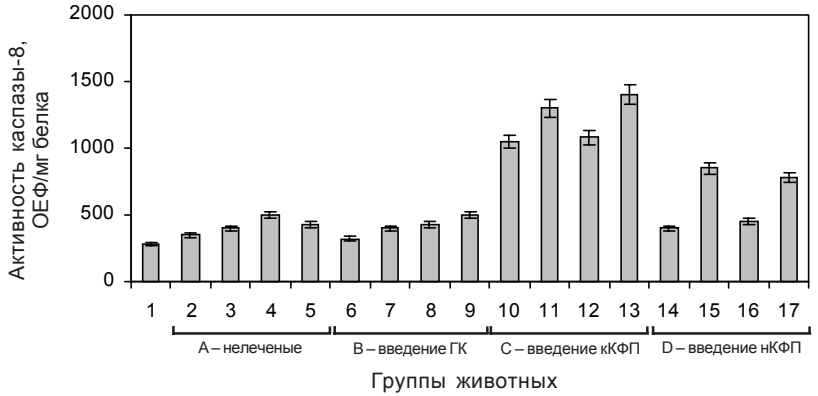


Рис. 33. Анализ активности каспазы-8. Нумерация групп животных приведена в табл. 1.

В обоих случаях речь может идти как об особенностях «акцепторных» взаимодействий медиатора (лиганда) с рецепторными структурами-мишенями в системе «донорский материал – организм реципиента», так и о дозозависимом эффекте этих медиаторов [64, 75]. Очевиден и тот факт, что продуцируемые КФП регуляторные медиаторы находят свои альтернативные пути активации либо ингибирования апоптотических каскадов, отличающиеся от используемых классическими индукторами апоптоза – ГК. Например, во всех исследуемых нами группах животных после лечения ГК была отмечена активация каспазы-3 (см. рис. 32), тогда как для каспазы-8 данный факт не был установлен (рис. 33, группа В). В то же время под действием препаратов КФП повышалась активность обеих исследуемых каспаз. Эти данные свидетельствуют о возможности КФП продуцировать такой набор регуляторных медиаторов, которые и обуславливают уникальную феноменологию проявления их активности у животных с АИЗ, в частности с АА.

Таким образом, получены оригинальные результаты экспериментальных исследований, основное внимание в которых сфокусировано на детальном анализе состояния гемопоэтического плацдарма и МФС при развитии АА, а также лечебного эффекта КФП при данной патологии. Доказана разбалансировка гемопоэтического плацдарма и иммунной системы реципиентов при развитии АА. Участие последней в формировании профиля гемопоэз-регулирующих медиаторов не вызывает сомнения. Моноцитарно-фагоцитарная система реципиентов при АИЗ, которая *a priori* определяет характер изменения цитокинового профиля, требует коррекции, как и гемопоэтическая. Представленные результаты подтверждают корригирующее влияние кКФП ранних сроков гестации с максимальной выраженностью через 2 недели после введения препарата на гемопоэтическую и иммунную системы реципиентов с АА. Нативные КФП ранних сроков гестации не проявляли такого эффекта, в отличие от КФП более поздних сроков, которые уже через 7 суток после введения восстанавливали медуллярное кроветворение реципиентов, что соответствовало максимальному снижению клинического показателя – ИА.

Полученные результаты свидетельствуют о способности как нативных, так и криоконсервированных КФП проявлять апоптоз-индуцибельную активность в отношении клеток МФС. Более выраженный проапоптотический эффект на клетки МФС зафиксирован после введения кКФП ранних сроков гестации, что может быть объяснено влиянием факторов криоконсервирования на активацию экспрессии различных лигандов для рецепторов смерти. Установленные особенности экспрессии белков CD95-каскада в клетках МФС после применения КФП свидетельствуют о возможности факторов криоконсервирования влиять на спектр продуцируемых ими биологически активных субстанций, а, следовательно, и на терапевтическую активность КФП. Отмечено, что механизм действия КФП в отношении модуляции апоптотических каскадов в клетках МФС животных с патологией принципиально отличается от действия глюкокортикоидов, применяемых при ревматоидном артрите, экспериментальной моделью которого является адъювантный артрит.

Представленные данные являются экспериментальным подтверждением возможности использования КФП как препаратов лечения ревматоидного артрита с обоснованием выбора схем их применения в клинической практике.

2.1.2. Лечение болезни «трансплантат против хозяина»

Существенной проблемой трансплантации гистонесовместимого костного мозга является развитие иммунного конфликта, выражающегося в реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), которая клинически манифестируется в виде болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ). Данная патология имеет признаки АИЗ и ассоциируется с появлением в организме «аутореактивного» клона иммунокомпетентных клеток, формируемого из донорских СКК [38]. Развивающаяся в этих условиях разбалансировка состояния T_{reg}-клеток [78, 163], помимо дисрегуляции иммунной системы, приводит к нарушению состояния гемопоэтического плацдарма [144]. Ранее нами было получено экспериментальное подтверждение возможности снижения иммунореактивности аллогенного КМ, манифестируемого БТПХ, путем его криоконсер-

вирования при использовании определенных режимов [26, 29], селективно изменяющих субпопуляционный состав миелотрансплантата. Однако это приводило к снижению его гемопоэтического потенциала. Альтернативным вариантом минимизации БТПХ является сотрансплантация с аллогенным КМ клеток, обладающих акцессорно-регуляторной активностью. К ним в определенной мере можно отнести КФП, которые обладают иммуно- и гемопоэзмодулирующей активностью.

В модели хронической БТПХ была продемонстрирована способность сотрансплантируемых КФП стимулировать гемопоэтическую функцию аллогенного криоконсервированного КМ [31] (рис. 34). Данный эффект был присущ именно фетальному материалу, поскольку клетки взрослой печени не оказывали подобного действия. Выяснение механизмов реализации такого эффекта явилось предметом ряда исследований.

Были получены данные о том, что сотрансплантация КФП с аллогенным кКМ не только корригировала состояние гемопоэза у реципиентов с хронической БТПХ, но и вызывала снижение его иммунореактивности [21, 30]. Это может реализоваться за счет увеличения содержания в организме реципиентов КМ T_{reg}-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$, обладающих, как известно, супрессивной активностью.

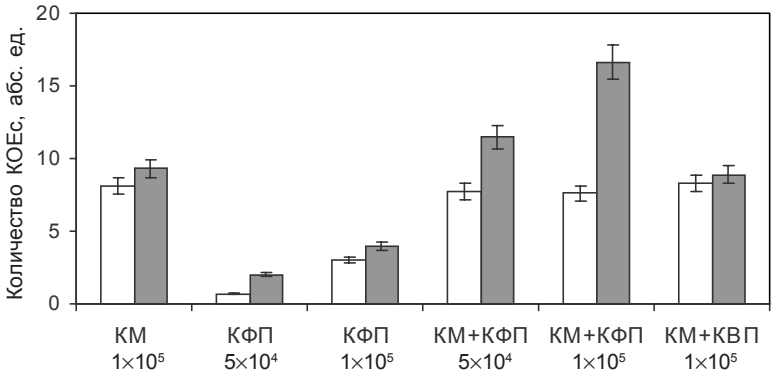


Рис. 34. Гемопоэзмодулирующий эффект КФП при сотрансплантации с аллогенным криоконсервированным КМ: □ – КОЕс-8; ■ – КОЕс-12.

В наших дальнейших исследованиях мы использовали модель острой РТПХ (оРТПХ), которую воспроизводили следующим образом: облученным в дозе 850 Р мышам линии (СВА/Н×С57Bl)F1 внутривенно вводили 5×10^6 клеток КМ / мышь с клетками лимфоузлов (СВА), которые составляли 30% от клеток КМ [74]. В качестве сингенного контроля использовали мышей того же генотипа, пола и возраста, которым вводили сингенные клетки КМ (F1) в том же количестве. Интактный контроль – здоровые животные (F1), не подвергавшиеся никаким манипуляциям. На этой модели на клеточном и молекулярном уровнях изучали состояние гемопоэтического плацдарма реципиентов (содержание СКК и МСК) и уровень экспрессии генов, отвечающих за гемопоэтическую активность СКК и иммуносупрессивную активность МСК после применения нативных и криоконсервированных КФП 14 и 18 суток гестации. Ранние и поздние сроки гестации ФП были выбраны для сравнительного исследования терапевтического эффекта КФП с различным исходным состоянием как до, так и после криоконсервирования.

Как видно на рис. 35, введение КФП сопровождалось минимизацией гипоплазии КМ, обусловленной развитием оРТПХ. Кроме того, было установлено существенное снижение содержания популяций СКК ($CD34^+CD38^-$) и МСК ($CD73^+CD106^+$) у животных

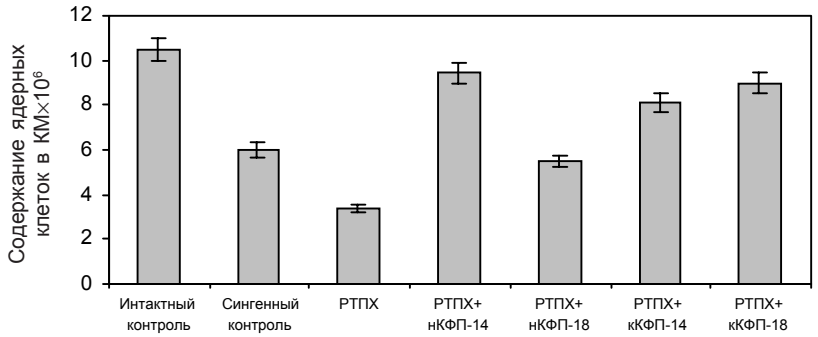


Рис. 35. Количество ядерных клеток в КМ животных с острой РТПХ до и после введения КФП; КФП вводили в момент индукции патологии, аттестацию исследуемых показателей осуществляли на 14-е сутки после применения КФП.

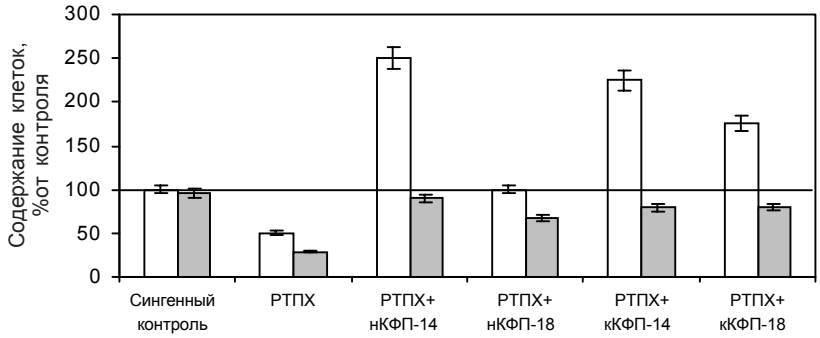


Рис. 36. Содержание в КМ животных с острой РТПХ клеток с фенотипическими признаками СКК (□, $CD34^+CD38^-$) и МСК (■, $CD73^+CD106^+$) до и после введения КФП; за 100% приняты показатели у интактных животных.

с оРТПХ (рис. 36), что совпадало с выраженной гипоплазией КМ (см. рис. 35) и согласуется с результатами, полученными другими авторами на такой же модели РТПХ [148, 217].

Введение нативных и криоконсервированных КФП разных сроков гестации приводило к увеличению содержания СКК и МСК в КМ животных с РТПХ. В отношении СКК эффект был выражен в большей степени, чем для МСК (рис. 36). Интересно отметить, что максимально корригирующей активностью в отношении МСК обладали нКФП-14, тогда как в отношении СКК – нКФП-18. Важно, что после криоконсервирования потенциал КФП обоих сроков гестации относительно СКК проявлялся в «гиперформе», как, впрочем, и у нКФП-14. Тем не менее во всех трех группах восстановление медуллярного кроветворения доходило до контрольного уровня (см. рис. 35).

Известно, что пролиферативный потенциал СКК в значительной степени обусловлен функционированием гена *gata2* [212]. Полученные нами данные (рис. 37) свидетельствуют о том, что степень экспрессии гена *gata2* в клетках КМ реципиентов с оРТПХ до и после введения КФП является подтверждением тех процессов, которые происходили в кроветворной системе исследуемых животных (см. рис. 36). Как видно, даже у реципиентов сингенного

КМ, несмотря на высокое содержание СКК, уровень экспрессии гена *gata2* снижался в 2 раза (рис. 37), что совпадает со снижением содержания миелокариоцитов в КМ этих животных. Данный факт может свидетельствовать о причастности гена *gata2* не только к процессу самоподдержания СКК, но и их дифференцировке в зрелые формы. Развитие оРТПХ приводило к еще большему снижению уровня экспрессии гена *gata2*, причем в данном случае была отмечена сходная тенденция между снижением содержания клеток стволового компартмента и гипоплазией КМ (см. рис. 35).

Нативные и криоконсервированные КФП независимо от сроков гестации в разной степени увеличивали экспрессию гена *gata2* в КМ реципентов с РТПХ, что было обусловлено изменением содержания СКК. Данный факт подтверждает причастность исследуемого транскрипционного фактора к процессу гемопоэза.

Известно, что МСК обладают иммуномодулирующим потенциалом, который реализуется при участии вырабатываемого ими фермента ИДО, активирующего Т-супрессорное звено иммунной системы [148, 174]. Известно, что клетки Т-ряда играют важную роль в регуляции функционального статуса СКК [78]. К развитию дисфункционального состояния при РТПХ как гемопоэтического плацдарма, так и к срыву иммунной толерантности может иметь непосредственное отношение нарушение функционального статуса

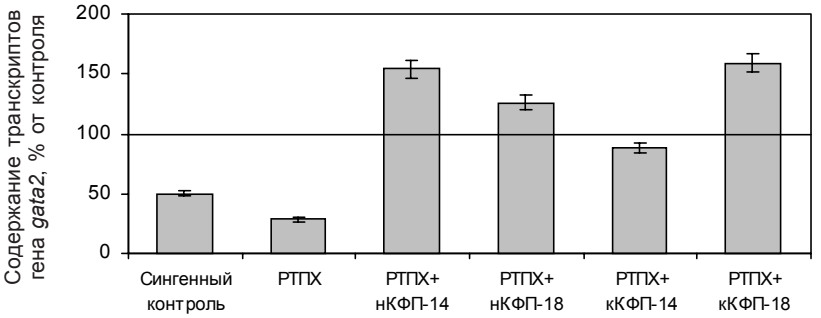


Рис. 37. Содержание транскриптов гена *gata2* в клетках КМ реципиентов с острой РТПХ до и после введения КФП; за 100% приняты показатели у интактных животных.

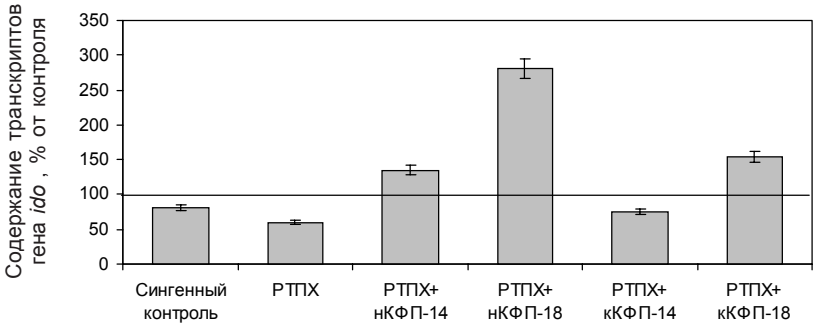


Рис. 38. Содержание транскриптов гена *ido* в клетках КМ реципиентов с острой РТПХ до и после введения КФП; за 100% приняты показатели у интактных животных.

МСК. В связи с этим в наших исследованиях проводилась оценка степени экспрессии клетками ФП (в первую очередь МСК) гена *ido*, влияние которого имеет непосредственное отношение к указанным процессам.

Отмечено, что уровень экспрессии гена *ido* в клетках КМ реципиентов с оРТПХ (на 14-е сутки развития) снижался почти в 2 раза по сравнению с интактным контролем (рис. 38). Введение нКФП-14 стимулировало экспрессию гена *ido* более чем в 2 раза по сравнению с этим показателем у нелеченых животных.

Криоконсервирование снижало потенциал стимуляции нКФП-14. Интересно, что максимальную экспрессию этого гена вызывало введение нКФП-18. Криоконсервирование КФП-18 приводило к снижению уровня экспрессии гена *ido* до уровня, определяемого в группе с введением нКФП-14. В этой ситуации не было соответствия между уровнем продукции транскриптов гена *ido* и содержанием МСК ($CD73^+CD106^+$). Например, их содержание в группе нКФП-18 было минимальным, тогда как степень экспрессии гена *ido* – максимальной.

Данный факт можно интерпретировать по-разному. Во-первых, КФП способны стимулировать пролиферацию МСК. Во-вторых, они изменяют этот потенциал относительно МСК в зависимости от срока гестации, а также после криоконсервирования. Наконец,

существуют различия у нативных и криоконсервированных КФП разного срока гестации в способности влиять именно на активность гена *ido* в МСК реципиента, которая может реализоваться вне зависимости от их количественного содержания в органе. Важно также учитывать то, что экспрессия гена *ido* присуща не только МСК, но и более дифференцированным потомкам, составляющим стромальное микроокружение.

Итак, при развитии оРТПХ нами показано нарушение состояния кроветворной системы, что может быть следствием изменения цитокинового профиля организма. В первую очередь, речь может идти о преобладании провоспалительных медиаторов, суперэкспансия которых является результатом нарушения состояния T_{reg}-клеток [45]. Поэтому важно было оценить характер изменения содержания этих клеток в условиях развития оРТПХ до и после введения КФП.

Исследование содержания T_{reg}-клеток с фенотипом $FOXP3^+$, $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{hi}$ в селезенке животных после введения КФП дает основание судить о способности иммунной системы обеспечивать толерантность при развитии оРТПХ.

Развитие оРТПХ приводило к снижению содержания $FOXP3^+$ и $CD4^+CD25^+$-клеток в 2–2,2 раза, тогда как $CD4^+CD25^{hi}$ – в 1,4 раза по сравнению с сингенным контролем (рис. 39, 40). Как

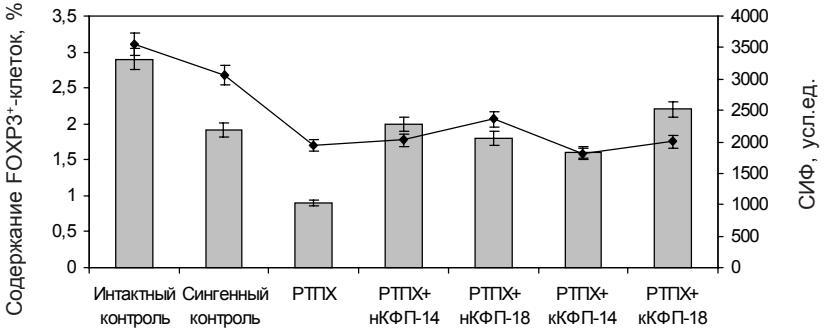


Рис. 39. Содержание $FOXP3^+$-клеток (□), а также СИФ (—) в селезенке животных с острой РТПХ до и после введения КФП.

указывалось выше, показатель, характеризующий степень экспрессии маркера в клетке или на мембране, – СИФ также снижался во всех популяциях T_{reg}, что может свидетельствовать об изменении функциональной активности этих клеток [10]. Кроме того, ранее было отмечено значительное снижение содержания $CD4^+CD25^+FOXP3^+$-клеток в селезенке реципиентов с оРТПХ, вызванной введением аллогенного КМ со спленоцитами [100].

После введения нативных или криоконсервированных КФП животным с оРТПХ содержание субпопуляций T_{reg}-клеток изменялось по-разному (рис. 39, 40). Во-первых, во всех случаях при

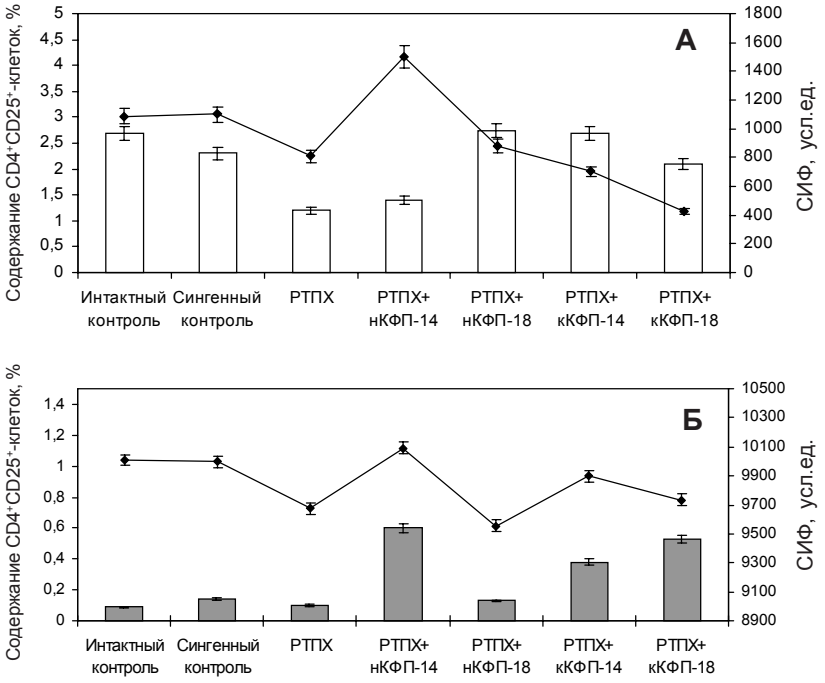


Рис. 40. Содержание клеток $CD4^+CD25^+$ (А, □) и $CD4^+CD25^{hi}$ (Б, ▩), и соответствующая СИФ (——) в селезенке животных с острой РТПХ до и после введения КФП.

введении КФП повышалось содержание $FOXP3^+$, $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^{hi}$-клеток. Максимальный корригирующий эффект был отмечен для каждой субпопуляции T_{reg}-клеток после введения нКФП-14 и кКФП-18. Что касается модуляции состояния клеток $CD4^+CD25^+$, то минимальное повышение их содержания было отмечено после введения животным нКФП-14 (рис. 40). Тем не менее эти клетки имели самый высокий показатель СИФ за счет наибольшего по сравнению с другими группами животных после введения КФП содержания $CD4^+CD25^{hi}$-клеток. К тому же введение нКФП-14, как, впрочем, и кКФП-18, приводило к максимальному повышению содержания $FOXP3^+$-клеток.

Низкая выживаемость реципиентов (рис. 41) является подтверждением «жесткости» развития БТПХ с такими проявлениями состояния гемопоэтической системы и T_{reg}-звена иммунной системы, которые были описаны выше. Прогрессивная гибель животных с оРТПХ начиналась с 4-х суток развития патологии, что согласуется с данными авторов, которые использовали подобную модель [74, 148, 217]. К 14 суткам выживало не более 25% животных этой группы.

Как видно на рис. 41, максимальная выживаемость реципиентов наблюдалась после введения нКФП-14 и кКФП-18, которая не

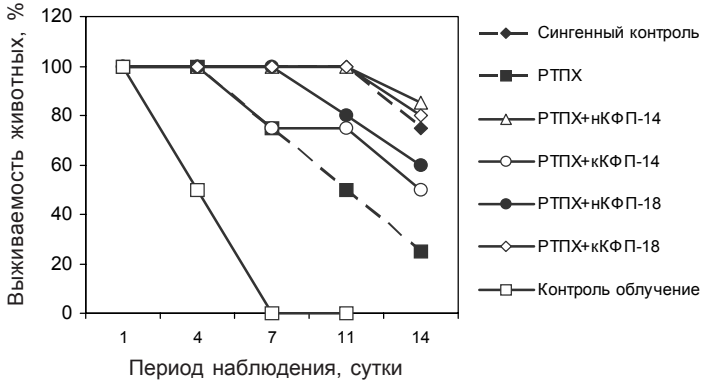


Рис. 41. Выживаемость животных в динамике развития острой РТПХ до и после введения КФП.

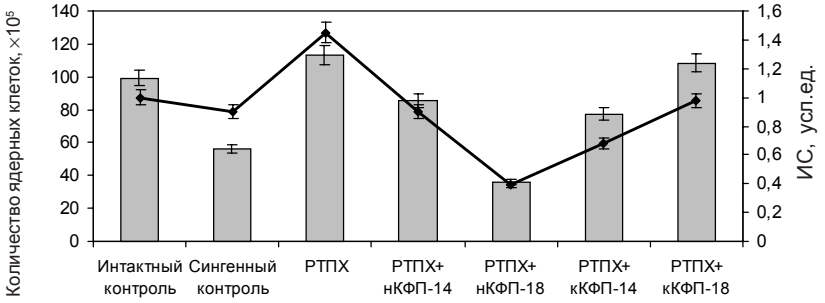


Рис. 42. Количество ядерных клеток (□) в селезенке и ИС (——) у животных с острой РТПХ до и после введения КФП.

отличалась от сингенного контроля. У животных этих же групп индекс селезенки (ИС) (рис. 42), который является четким подтверждением выраженности развития РТПХ, также достоверно не отличался от интактного и сингенного контролей.

В последние годы иммунореактивность тех или иных клеток определяется по их способности вызывать локальную РТПХ (лРТПХ), как более чувствительную и относительно простую в индукции. Локальную РТПХ индуцировали у мышей линии С57Bl/6 путем подкожного введения 2×10^7 клеток лимфоузлов мышей линии СВА/Н в подушечку задней лапы по общепринятой методике [49]. Контрольным мышам линии С57Bl/6 вводили физиологический раствор.

В модели лРТПХ также была подтверждена способность КФП проявлять иммунокорригирующую активность в отношении T_{reg}. Более того, и в данной модели максимальная ее выраженность как в отношении $FOXP3^+$, так и $CD4^+CD25^{hi}$-клеток наблюдалась после введения нКФП-14 и кКФП-18 (рис. 43).

Принципиально важным является тот факт, что как и при аттестации в оРТПХ, в модели лРТПХ криоконсервирование минимизировало иммуномодулирующий потенциал КФП ранних сроков гестации (КФП-14), но повышало – поздних сроков (КФП-18). В очередной раз получено подтверждение тезиса, что криочувст-

вительность биообъекта определяется его исходным структурно-функциональным статусом [23].

Известно, что в реализации процесса формирования T_{reg}-клеток и проявлении ими супрессорной функции активное участие принимает ТРФ-β [203]. Этот медиатор индуцирует экспрессию рецептора ИЛ-2 (CD25) и синтеза белка FOXP3 в нативных $CD4^+CD25^-$ – Т-хелперах, переводя их в категорию T_{reg}. Полученные нами результаты показали снижение степени экспрессии гена *tgfβ* в клетках лимфоузлов при развитии лРТПХ в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 44, 45). Введение КФП приводило к увеличению этого показателя.

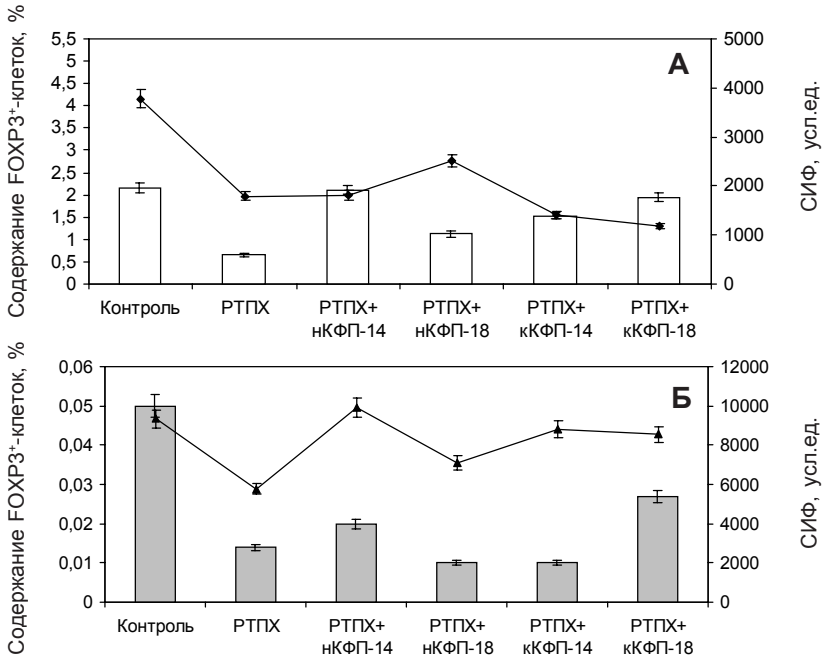


Рис. 43. Содержание клеток $FOXP3^+$ (А, ☐) и $CD4^+CD25^{hi}$ (Б, ▩) и соответствующая СИФ (——) в региональном лимфоузле животных с локальной РТПХ на 5-е сутки до и после применения КФП разного вида и срока гестации.

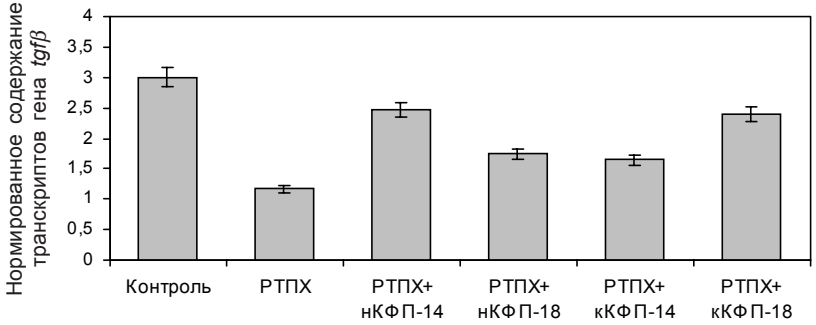


Рис. 44. Нормированное содержание транскриптов гена *tgfβ* по гену «домашнего хозяйства» (*beta actin*) в клетках лимфоузлов реципиентов с локальной РТПХ до и после введения КФП.

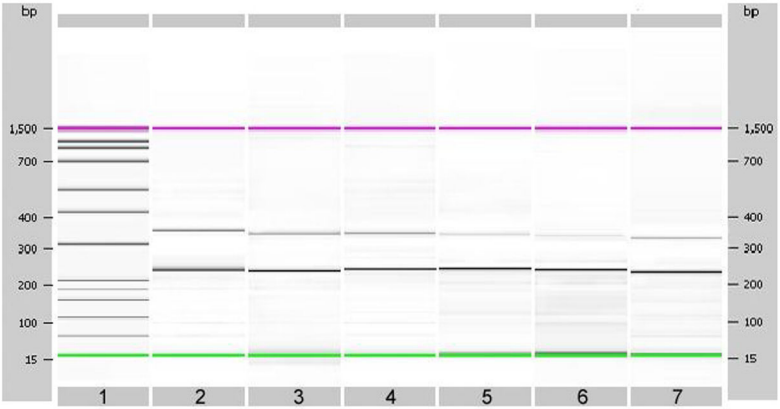


Рис. 45. Фореграмма продуктов амплификации транскриптов гена *tgfβ* методом ОТ-ПЦР в клетках лимфоузлов реципиентов с локальной РТПХ до и после введения КФП: 1 – маркер длины фрагмента; 2 – контроль; 3 – РТПХ; 4 – РТПХ после введения нКФП-14; 5 – РТПХ после введения нКФП-18; 6 – РТПХ после введения кКФП-14; 7 – РТПХ после введения кКФП-18. Длина фрагмента продукта амплификации гена *tgfβ* 369 п.н. 2–7 – верхняя полоса – ампликоны *tgfβ* (таргетный ген), нижняя – *beta actin* (ген «домашнего хозяйства»).

Максимальное повышение содержания T_{reg}-клеток (см. рис. 43) и уровня экспрессии гена *tgfβ* в лимфоузлах животных после введения нКФП-14 и кКФП-18 подтверждает его ведущую роль в индукции данного типа регуляторных клеток.

Очевидно, что независимо от модели РТПХ и вызванной ею БТПХ существуют общие закономерности развития данной патологии и терапевтического эффекта клеток фетальной печени. Минимизация проявления клинических признаков и интенсивности развития иммуновоспалительной реакции при РТПХ реализуется через коррекцию состояния субпопуляций иммунокомпетентных клеток с регуляторной активностью – T_{reg}. Максимальным эффектом стимуляции этих клеток и экспрессии генов *gata2*, *ido* и *tgfβ* обладали нативные клетки фетальной печени 14-х и криоконсервированные клетки 18-х суток гестации. По-видимому, данный факт можно объяснить тем, что при сравнительном изучении функционального потенциала этих КФП они имели наиболее высокую по сравнению с другими исследуемыми КФП степень экспрессии гена *ido* и уровень продукции ТРФ-β, которым, как известно, принадлежит ключевая роль в активации супрессорного звена иммунной системы [203].

2.1.3. Метод превентивного лечения некоторых форм онкопатологий

Использование КФП в комплексной терапии онкологических заболеваний первоначально играло роль заместительной терапии после применения цитостатиков. В последнее время появились данные о противоопухолевых свойствах КФП, свидетельствующие об их способности предотвращать развитие метастазов, ингибировать пролиферацию опухолевых клеток [4, 5, 8, 37, 70]. Особого внимания заслуживает направление исследований по оценке эффективности превентивной терапии КФП при угрозе развития онкопатологии. Этому способствует информация о возможности идентификации ранних «предвестников» развития онкопатологии в виде тех или иных показателей, например стволовых раковых клеток (СРК) [201]. В экспериментальных исследованиях было показано, что при генетически детерминированном развитии рака

молочной железы (РМЖ) уже на ранних этапах онкогенеза в ней выявляются клетки с признаками СРК, которые в высокой степени экспрессируют маркер CD44 – $CD44^{hi}$ [131].

Нами были проведены исследования на экспериментальной модели РМЖ по изучению способности КФП проявлять антибластомное действие [17, 131]. Вирусная природа развития опухоли молочной железы (МЖ) у мышей линии С3Н общеизвестна [152] и связана с экспансией в их организме вируса MMTV. Этот вирус переносится через молоко самок и способен «акцептироваться» не только тканями МЖ, но и другими структурами организма [149]. Особенностью этого вируса является «рекрутирование» им иммунной системы хозяина, чтобы попасть в клетки эпителия МЖ, для которых он является канцерогенным (рис. 46).

В наших исследованиях было установлено снижение частоты развития РМЖ мышей линии С3Н к 16-му месяцу при превентивном введении КФП в разных дозах за 4–5 месяцев до начала клинической манифестации патологии, причем как при использовании нативного, так и криоконсервированного по двухэтапной программе замораживания [57] материала (табл. 2). У выживших мышей к 16 месяцу не наблюдалось развития пальпируемых опухолей в МЖ. Отсутствие эффекта у мышей линии С3Н, которым в качестве превентивной терапии были введены клетки взрослой печени (КВП, контроль) свидетельствует о том, что лечебным потенциалом обладали именно КФП.

Рис. 46. Жизненный цикл вируса MMTV.

Как видно из представленных данных, антибластомная активность КФП зависит от вида и дозы введенных клеток. Так, наиболее выраженным эффектом снижения частоты развития опухоли обладали кКФП в дозе 5×10^6 клеток/мышь и нКФП в дозе

Таблица 2. Частота развития РМЖ и выживаемость мышей линии С3Н

Группа мышей	Частота развития РМЖ, %	Выживаемость животных, %
С3Н	75,31 ± 2,54	31,47 ± 4,73
С3Н + КВП ($1x10^6$)	$70,27 \pm 3,52^{1,3}$	$45,07 \pm 1,11^{1,3}$
С3Н + КВП ($5x10^6$)	$66,74 \pm 3,34^{1,2}$	$37,51 \pm 3,12^{1,2}$
С3Н + кКФП ($1x10^6$)	$50,62 \pm 4,27^{1,2,3}$	$57,54 \pm 3,97^{1,2,3}$
С3Н + нКФП ($1x10^6$)	$36,48 \pm 2,43^{1,2,3}$	$70,46 \pm 2,00^{1,2,3}$
С3Н + кКФП ($5x10^6$)	$43,65 \pm 2,49^{1,2,3}$	$81,65 \pm 3,38^{1,2,3}$
С3Н + нКФП ($5x10^6$)	$58,57 \pm 3,84^{1,2,3}$	$67,53 \pm 1,76^{1,2,3}$

Примечания: степень достоверности расхождения ($p < 0,05$) по сравнению с показателями следующих групп: 1 – без введения препаратов; 2 – с введением КВП в дозе 1×10^6 клеток/мышь; 3 – с введением КВП в дозе 5×10^6 клеток/мышь.

1×10^6 клеток/мышь. В этих же дозах кКФП и нКФП обеспечивали и более высокую выживаемость животных к 16-му месяцу, хотя абсолютной корреляции частоты развития опухоли и выживаемости мышей в каждой из этих групп выявлено не было.

Концепция причастности к развитию злокачественных новообразований несостоятельности иммунной системы [50, 60, 63] определяет необходимость более детальной оценки ее статуса и в данном случае. Действительно, у мышей линии С3Н при развитии РМЖ существенно нарушалось состояние клеточного и гуморального звеньев иммунитета, а также МФС, что, по данным многих авторов, обусловлено рядом причин, в том числе и изменением цитокинового профиля организма при развитии онкопатологии [161, 202, 208]. Во многих работах акцентируется внимание на повышенном уровне содержания у опухоленосителей T_{reg}-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$ [164], что является неблагоприятным прогностическим фактором.

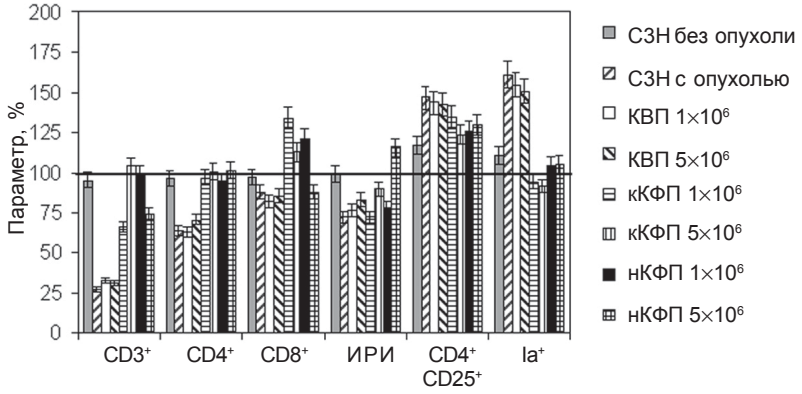


Рис.47. Фенотипические характеристики клеток селезенки мышей С3Н до и после превентивного лечения; за 100% приняты показатели мышей линии СВА.

Превентивно введенные кКФП и нКФП корригировали большинство показателей иммунной системы. В клеточном звене иммунитета отмечали улучшение показателей общего количества Т-лимфоцитов, соотношения Т-хелперов ($CD4^+$) и Т-супрессоров ($CD8^+$), содержания Ia^+ клеток (рис. 47). Явно выраженный положительный эффект проявляли КФП и в отношении T_{reg}-клеток.

Как видно из рис. 47, максимальное проявление иммуномодулирующего эффекта наблюдалось именно при введении нКФП в дозе 1×10^6 клеток/мышь и кКФП – 5×10^6 клеток/мышь.

Отмечен дозозависимый терапевтический эффект КФП по показателю изменения цитотоксической активности ЕК, играющих ключевую роль в противоопухолевой резистентности [166]. Установлено существенное снижение содержания ЕК-клеток при развитии патологии (рис. 48). Важно, что максимальное приближение показателя к норме обеспечивали обе дозы кКФП. Удивительно, но меньшая доза нКФП, которая максимально снижала частоту развития опухоли, практически не изменяла этот показатель по сравнению с леченными животными. В то же время введение нКФП в дозе 5×10^6 обеспечивало невысокий процент выживаемости животных с РМЖ, хотя наблюдалась гиперактивация

активности ЕК-клеток. Данный факт четко подтверждает участие клеток иммунной системы в реакции противоопухолевой защиты и альтернативный путь ее реализации кКФП по сравнению с нКФП. Это может быть обусловлено изменением как компонентного состава КФП после криоконсервирования, так и спектра продуцируемых ими медиаторов с антибластомной активностью [35]. Возможно, каждый из продуцируемых кКФП медиаторов находит свою точку приложения в том или ином компартменте иммунной системы с соответствующей формой его функциональной трансформации. Другими словами, после криоконсервирования субстраты с иммуномодулирующим потенциалом КФП меняют направленность действия по сравнению с нКФП в том или ином звене иммунной системы реципиента-опухоленосителя. Некоторые показатели клеточного звена иммунитета приближались к норме после введения больших/меньших доз КФП. В пользу этого свидетельствуют и результаты оценки уровня содержания мелкодисперсных циркулирующих иммунных комплексов (мЦИК), количества перитонеальных макрофагов и их адгезивных свойств, фагоцитарной активности (рис. 48, 49). Нормализация содержания мЦИК у животных после введения КФП может быть напрямую связана с восстановлением под влиянием проведенной терапии

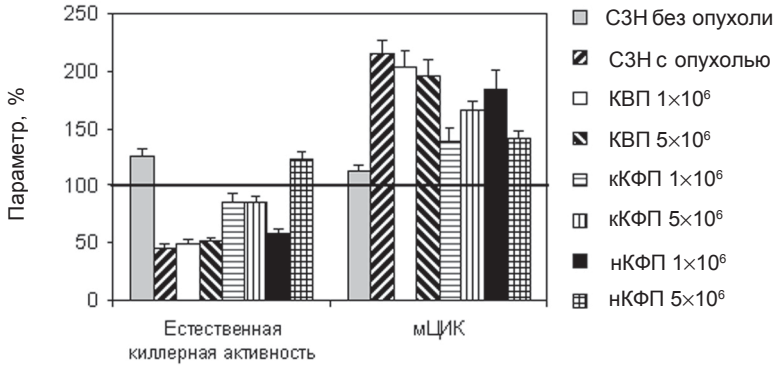


Рис. 48. Естественная киллерная активность спленоцитов и содержание мЦИК в сыворотке крови мышей СЗН до и после превентивного лечения; за 100% приняты показатели мышей линии СВА.

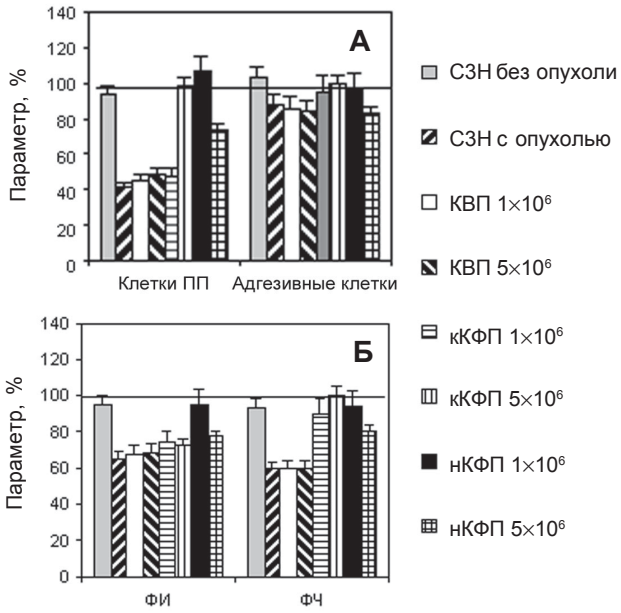


Рис. 49. Адгезивная способность (А) и фагоцитарная активность (Б) клеток моноцитарно-фагоцитарной системы мышей СЗН до и после превентивного лечения; за 100% приняты показатели мышей линии СВА; ПП – перитонеальная полость; ФИ – фагоцитарный индекс; ФЧ – фагоцитарное число.

активности клеток МФС, в частности перитонеальных макрофагов (рис. 49), одной из главных функций которых является элиминация ЦИК.

Известно, что клетки иммунной системы обладают уникальной способностью проявлять цитотоксическую активность как по отношению к общему пулу опухолевых клеток, так и СРК в очаге малигнизации [95, 213]. Из этого следует, что состоятельность противоопухолевой защиты иммунной системы может быть оценена по содержанию СРК в опухолевых сайтах. Показано, что экспансия опухолевых предшественников с гиперэкспрессией молекулы CD44 ($CD44^{hi}$) является необходимым условием роста опухоли, ее инвазии, метастазирования и т. д. [173]. Подобного

рода характеристиками, но в меньшей степени, обладают и более дифференцированные предшественники с фенотипом $CD44^+CD24^-$ [218].

В наших исследованиях было установлено, что у выживших к 16-му месяцу мышей линии С3Н экспансия $CD44^{hi}$ клеток (СРК), $CD44^+CD24^-$- и $CD44^+CD24^+$-предшественников в МЖ определялась характером выраженности опухолевого процесса (рис. 50).

Так, даже у мышей без визуально и пальпаторно определяемой опухоли МЖ отмечали достоверное увеличение содержания $CD44^+CD24^-$-клеток и СРК по сравнению с контролем. При этом увеличение содержания наиболее дифференцированных клеток $CD44^+CD24^+$ не наблюдалось, что свидетельствовало о возможности дальнейшей экспансии процесса.

Клиническая манифестация в МЖ опухолевого процесса характеризовалась изменением содержания каждой из определяемых субпопуляций клеток-предшественников по сравнению

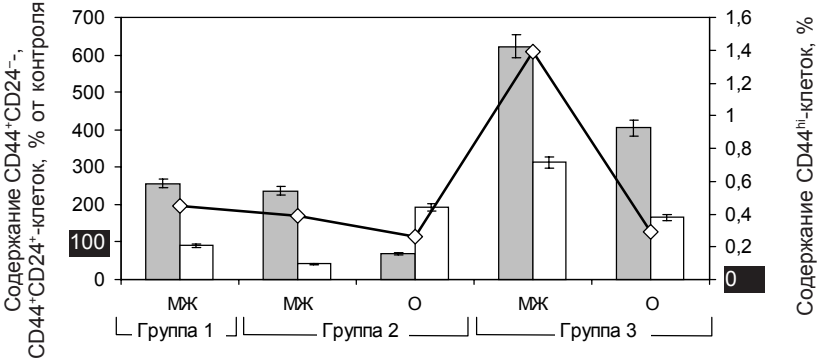


Рис. 50. Содержание клеток $CD44^+CD24^-$ (□), $CD44^+CD24^+$ (□), $CD44^{hi}$ (—) в МЖ: О – ткань опухоли у мышей линии С3Н без лечения; группа 1 – без визуального проявления патологического процесса; группа 2 – с развитием единичной опухоли; группа 3 – с развитием нескольких опухолей. 100, 0 – контроль СВА; за 100% приняты значения содержания клеток $CD44^+CD24^-$, $CD44^+CD24^+$ у мышей линии СВА, количество $CD44^{hi}$-клеток дано в процентах относительно общего пула клеток МЖ.

с контролем. При этом характер таких изменений во многом зависел от количества развившихся опухолей в МЖ. При появлении одной опухоли количество СРК и $CD44^+CD24^-$-клеток в ткани МЖ незначительно отличалось от такового у мышей без опухоли, тогда как количество наиболее дифференцированных $CD44^+CD24^+$ снижалось в 2 раза. В самой же опухоли содержание клеток $CD44^+CD24^+$ повышалось в 2 раза, СРК ($CD44^{hi}$) было на уровне контроля, а клеток $CD44^+CD24^-$ – достоверно ниже. Возможно, данный факт обусловлен ростом опухолевого сайта и необходимостью экспансии в нем более дифференцированных клеток. Нельзя также отрицать возможную миграцию СРК из опухоли и других органов в ткани МЖ [142].

Дальнейшая экспансия опухолевого процесса подтверждается тем, что при формировании нескольких опухолевых сайтов наблюдалось явно выраженное увеличение опухолевых предшественников всех уровней дифференцировки в тканях МЖ без визуально определяемой опухоли. Удивительным был характер повышения содержания каждой из субпопуляций этих клеток: почти в 15 раз наиболее потентных клеток $CD44^{hi}$, в 6–7 раз клеток $CD44^+CD24^-$ и всего в 3 раза наиболее дифференцированных $CD44^+CD24^+$-клеток. Вместе с тем в самих опухолях отмечено значительно более низкое содержание СРК с фенотипом $CD44^{hi}$ и наиболее дифференцированных клеток $CD44^+CD24^+$ на фоне максимальной экспансии $CD44^+CD24^-$-предшественников по сравнению с клетками МЖ мышей без визуально определяемой опухоли.

Складывается впечатление, что на фоне динамично и поэтапно формирующихся опухолевых очагов СРК ($CD44^{hi}$) эмигрируют из них и «завоевывают» новые плацдармы для своей дальнейшей экспансии. Данный факт очередной раз подтверждает канцерогенность и метастатическую активность именно этой популяции опухолеиндуцирующих клеток [173].

Представленные на рис. 51 данные свидетельствуют о том, что разные виды превентивного лечения КФП по-разному влияли на содержание тех или иных канцерогенных предшественников. Во-первых, как кКФП, так и нКФП имели свою «специфику» выраженности модифицирующего эффекта. Интересно, что все виды фетального материала снижали содержание СРК ($CD44^{hi}$)

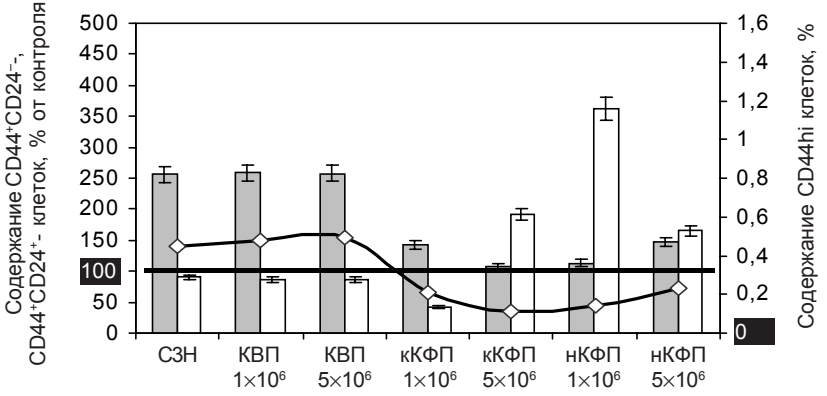


Рис. 51. Содержание клеток $CD44^+CD24^-$ (□), $CD44^+CD24^+$ (□), $CD44^{hi}$ (——) в МЖ мышей линии С3Н после введения КВП, кКФП и нКФП; 100, 0 – контроль СВА; за 100% приняты значения содержания клеток $CD44^+CD24^-$, $CD44^+CD24^+$ у мышей линии СВА, количество $CD44^{hi}$-клеток дано в процентах относительно общего пула клеток МЖ.

и $CD44^+CD24^-$-клеток в МЖ. Неудивительно, что данные показатели были максимально приближены к контрольным при использовании кКФП в дозе 5×10^6 клеток/мышь и нКФП – в дозе 1×10^6 клеток/мышь. Неожиданными оказались данные о повышении содержании в МЖ мышей этих групп (особенно при введении нКФП в дозе 1×10^6 клеток/мышь) наиболее дифференцированных $CD44^+CD24^+$-клеток. Этот факт может свидетельствовать о способности медиаторов ФП не только мобилизировать иммунную систему опухоленосителя на инактивацию СРК, но и обуславливать их дифференцировку в менее канцерогенную форму клеток. Действительно, в системе *in vitro* была продемонстрирована способность экстрактов фетальной печени вызывать активацию генов дифференцировки в клетках эмбриональных телец [168], которые имеют сходные признаки не только в экспрессии раково-эмбриональных антигенов, но и экспрессии общих stemness-генов [115] .

Таким образом, на мышах линии С3Н с генетически-детерминированным развитием РМЖ были выявлены новые факты,

определяющие характер экспансии этой патологии в целом, а также канцерогенные субстраты в виде опухолеиндуцирующих клеток (СРК) собственно в опухолевых сайтах МЖ. Более того, МЖ, являясь сложной иерархически организованной структурой, состоит из гетерогенных популяций, соотношение которых позволяет определять особенности протекания малигнизации, что важно при оценке эффективности применения КФП в качестве превентивной терапии патологии. Установлено, что терапевтический эффект, оцененный по совокупности показателей, был свойственен в большей степени кКФП, введенным в дозе 5×10^6 клеток/мышь, и нКФП – в дозе 1×10^6 клеток/мышь. Как отмечалось, выявленный ингибирующий эффект КФП в отношении СРК мог реализоваться как через активацию иммунных механизмов противоопухолевой защиты, так и путем непосредственного воздействия на эти клетки ряда факторов, продуцируемых КФП. Среди них следует выделить продуцируемый гепатобластами ФП α-фетопротеин, который обладает апоптоз-индуцирующей активностью в отношении опухолевых клеток [42, 106, 108, 198]. Существует мнение, что α-фетопротеин селективно акцептируется интенсивно пролиферирующими клетками, в частности эмбриональными или раковыми [42]. Его противоопухолевая активность является дозозависимой [62]. Благодаря выявленным противоопухолевым свойствам, α-фетопротеин используют для приготовления лекарственных препаратов, применяемых при различных формах онкопатологии [73, 200].

Противоопухолевыми свойствами обладает также протеин фетального происхождения – фетуин [189]. По данным T. Ohnishi и соавт. [183], его противоопухолевая активность реализуется путем ингибиции связывания факторов роста гепатоцитов с их рецептором. Не исключена способность фетуина ингибировать рост опухоли и выступать антагонистом трансформирующего фактора роста [105, 205]. Была продемонстрирована способность фетуина ингибировать связывание ТРФ-β1 с его рецептором и блокировать фосфорилирование и ядерную транслокацию Smad2/3 (Sma-MAD, mother against decapentaplegic) [205]. Подобно α-фетопротеину, фетуин проявляет и апоптозиндуцирующие свойства [231].

К реализации антибластомного действия КФП может быть причастен и онкостатин М [139], представляющий собой плейо-

тропный цитокин семейства интерлейкина-6. Онкостатин М способен проявлять онкостатические свойства за счет запуска канцерогенных клеток в дифференцировку, как было показано в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [104, 124, 232]. Именно этот эффект был отмечен при оценке содержания опухолеиндуцирующих клеток в МЖ мышей линии С3Н после применения КФП с констатацией факта экспансии наиболее продвинутых в дифференцировке $CD44^{+}CD24^{+}$ предшественников. Механизм такой активности онкостатина М реализуется через активацию регулирующей внеклеточные сигналы киназы – сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 и 3. Установленное одновременное существенное снижение СРК ($CD44^{hi}$) в МЖ после введения «оптимальных» форм КФП согласуется с данными [185] о способности онкостатина влиять и на процессы метастазирования опухолей.

Итак, используя мышей линии С3Н с генетически детерминированным развитием РМЖ, было установлено, что введение КФП животным задолго до клинической манифестации патологии, т. е. превентивно, активирует противоопухолевую защиту реципиента, что проявляется в снижении частоты развития опухоли и повышении процента выживаемости животных. Такой потенциал КФП могут реализовать многовекторно, а именно: опосредованно – через активацию иммунных механизмов противоопухолевой защиты и непосредственно – через продуцируемые КФП факторы, проявляющие противоопухолевое действие [124, 231]. В связи с этим весьма интересно, что факторы криоконсервирования способны модифицировать противоопухолевую активность КФП. К настоящему времени накоплено достаточно данных о значимости различных популяций КФП в продукции ими широкого спектра регуляторных медиаторов [204]. Каждая из субпопуляций КФП имеет свои «специфические» физические, структурные и, наконец, функциональные характеристики [40], а, следовательно, различную криочувствительность [23, 57, 77]. Полученные результаты показали, что кКФП существенно отличались в проявлении антибластомного эффекта от нКФП. При этом разный эффект был обусловлен не только дозой вводимого материала, но и «точкой приложения» активности как в отношении иммунной системы, так и компартмента опухолеиндуцирующих предшественников. Оче-

видно, что такие особенности могут быть связаны, прежде всего, с различным характером влияния криоконсервирования как на количественное содержание, так и на медиаторпродуцирующую активность определенных субпопопуляций КФП. Действительно, тот факт, что кКФП, введенные даже в меньшей дозе по сравнению с нКФП, проявляли по ряду показателей большую активность, может свидетельствовать об определенной форме обогащения общего пула КФП после криоконсервирования клетками, продуцирующими конкретный медиатор [131].

Таким образом, криоконсервирование является фактором регуляции состояния биообъекта с существенной модификацией его субпопуляционного состава и функциональных свойств.

2.2. Применение клеток плаценты при лечении адъювантного артрита

Результаты применения криоконсервированных клеток плаценты в экспериментальной модели РА – адъювантном артрите (АА) – представлены во многих исследованиях [18, 52]. Тем не менее данные об эффективности использования этих клеток варьируют, что может свидетельствовать о разном характере изменений в данном биологическом объекте после использования тех или иных режимов замораживания-оттаивания и проявления ими разной функциональной активности. Ранее было показано, что выбор условий криоконсервирования суспензии клеток плаценты (СКП) определяет содержание в ней клеточных популяций [51]. Так, после криоконсервирования СКП с 10%-м раствором ДМСО снижалось количество клеток Кащенко-Хофбауэра, повышалось количество клеток цитотрофобласта, лимфоцитов по сравнению с нативной суспензией. Криоконсервирование с 10%-м раствором пропандиосахароля (ПДС) позволяло сохранить клетки Кащенко, но при этом количество лимфоцитов и фибробластов существенно снижалось.

Представленная работа выполнена на мышах линии СВА/Н, массой 16–18 г. Плаценту выделяли у животных на 18–19 сутки гестации. Для получения суспензии плаценту измельчали и дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера, фильтровали через нейлоновый фильтр. Криоконсервирование СКП проводили в крио-

пробирках («Nunk», Denmark) под защитой 10%-го раствора ДМСО или пропандиосахароля (ПДС). Образцы криоконсервировали на программном замораживателе УОП-1 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины).

Адъювантный артрит индуцировали субплантарным введением полного адъюванта Фрейнда в дозе 0,05 мл/мышь, содержащего 1,5 мг/мл *Micobacterium tuberculosis* на 100 г массы животного.

Нативную или криоконсервированную СКП (нСКП и кСКП соответственно) вводили на 7-е сутки развития АА в дозе 1×10^6 клеток на мышь. Животные были разделены на группы по 7 мышей в каждой: 1 – с АА; 2 – введение животным с АА нСКП; 3 – введение кСКП с 10% ДМСО (суспензия КД); 4 – введение кСКП с 10% ПДС (суспензия КП); 5 – введение интактным животным физиологического раствора (контроль). Эффект лечения АА оценивали по ИА и содержанию в костном мозге клеток с фенотипическими признаками СКК ($CD34^+CD38^-$ и $CD117^+$), которые определяли с помощью моноклональных антител («BD Pharmingen», «Abcam») по протоколам производителей на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Экспрессию генов *c-kit*, *gata2* оценивали методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) по протоколам «Diatom RNA Prep100» («Isogene Lab», Россия), «GenePac PCR Core» («Биоком», Россия) в КМ мышей.

Как видно из рис. 52, после введения криоконсервированной в различных условиях СКП динамика снижения ИА, основного клинического показателя при АА, была разной.

Важную роль в развитии аутоиммунных реакций при РА играют Т-регуляторные (T_{reg}) клетки $CD4^+CD25^+$, обладающие супрессорной активностью [78]. Способность структур плаценты продуцировать факторы активации функции T_{reg}-клеток (ИЛ-2, ТФР-β) [98], увеличивать количество клеток с фенотипом T_{reg}-клеток ($CD4^+$ $CD25^{high}$ и $CD4^+/FOXP3^+$) при сокультивировании в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) может быть предпосылкой использования СКП для восстановления функции T_{reg}-клеток при АА.

При определении взаимосвязи между клинической манифестацией развития АА и изменением содержания T_{reg}-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$ в лимфоидных органах мышей нами было

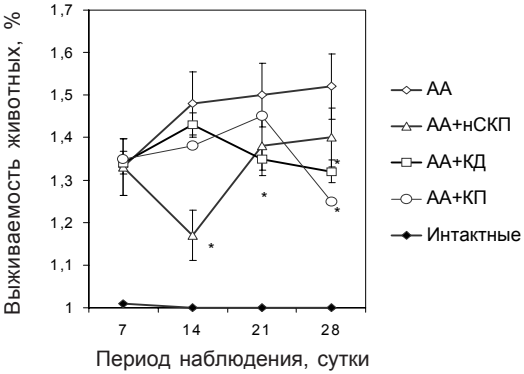


Рис. 52. Индекс артрита до и после введения СКП; * – достоверные отличия при сравнении исследуемой группы и группы животных с АА, $p < 0,05$.

установлено существенное увеличение их количества на 7-е сутки развития АА в лимфоузлах и на 21-е сутки в селезенке (рис. 53, А). Это может быть результатом экспрессии CD25-структур в ответ на вырабатываемые в остром периоде заболевания простагландин Е2, ИЛ-2, интерферон-γ (ИНФ-γ) [233]. Тем не менее высокий ИА, даже при увеличении количества T_{reg}-клеток, вероятно, связан с недостаточной продукцией этими клетками супрессорных факторов при пролиферации [210]. Усиление отека коррелировало со снижением количества T_{reg}-клеток при хронической фазе развития АА в лимфоузлах (14–28-е сутки) и селезенке (21–28 сутки). После введения нСКП индекс артрита существенно снижался на 14-е сутки, однако эффект был кратковременным – к 28-м суткам отек сустава снова увеличивался. У этих животных динамика накопления T_{reg}-клеток в лимфоидных органах была обратной (рис. 53, Б): на 14 сутки их количество повышалось в исследованных органах, а к 28-м суткам снижалось.

После введения суспензии КД (рис. 53, В), несмотря на повышение количества T_{reg}-клеток на 14-е сутки в лимфоузлах и селезенке, ИА не снижался, что может свидетельствовать об отсутствии функциональной активности T_{reg}-клеток. Только к 28-м суткам отмечалось его снижение на фоне нормализации количества T_{reg}-клеток в селезенке. Преобладание в суспензии КД клеток цитотрофобласта и лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-2, может привести

к стимуляции не только T_{reg}-клеток, но и цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов.

После введения КП на 14-е сутки развития патологии на фоне снижения ИА отмечено высокое содержание T_{reg}-клеток в лимфоузлах по сравнению с контролем (рис. 53, Г) и количеством этих клеток после введения КД (211,5 ± 15,8, 168,9 ±11,9 соответственно;

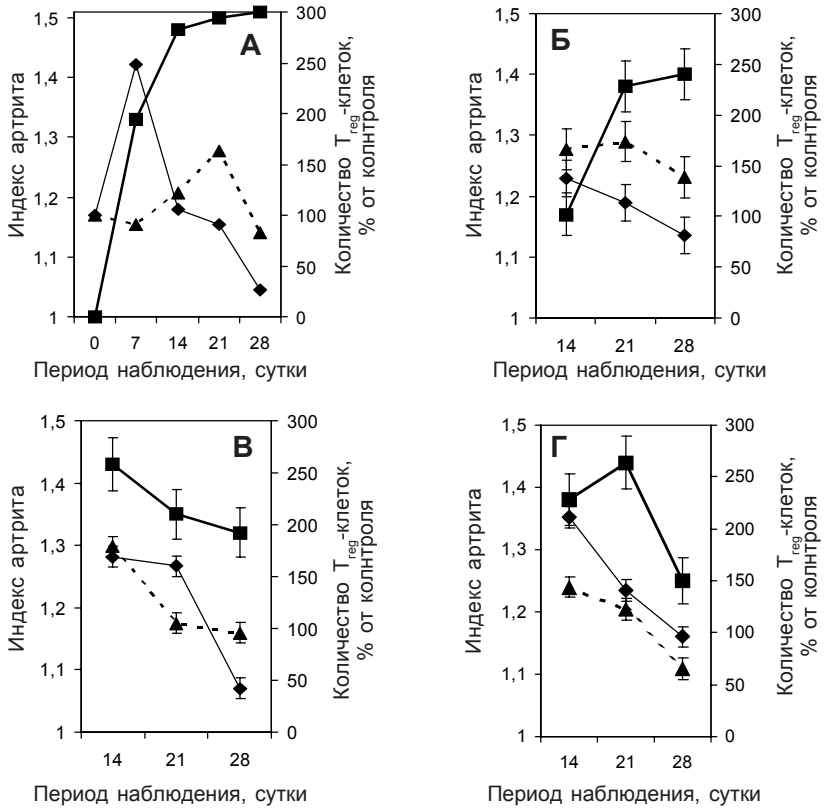


Рис. 53. Индекс артрита (■) и количество T_{reg}-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$ в лимфоузлах (◆) и селезенке (▲) при АА (А) и после введения нСКП (Б), суспензий КД (В) и КП (Г); за 100% принято содержание T_{reg}-клеток у интактных животных.

$p < 0,05$). На 28-е сутки (уменьшение отека) количество T_{reg}-клеток в лимфоузлах было близко к контролю, а в селезенке – выше контроля (рис. 53, Б), но ниже, чем при использовании КД (143,8 ± 12,8, 178,7 ± 8,9 соответственно; $p < 0,05$).

Таким образом, терапевтическая эффективность вводимого материала КД коррелировала с содержанием T_{reg}-клеток в селезенке, а КП – с их содержанием в лимфоузлах и селезенке. На 14-е сутки развития АА на фоне разной терапевтической эффективности после введения суспензий КД и КП в этот срок установлены различия в содержании T_{reg}-клеток в селезенке и лимфоузлах исследуемых животных.

Известно, что цитокины ИЛ-10, ТРФ-β способны индуцировать активность T_{reg}-клеток и опосредовать их действие [78]. Кроме того, в настоящее время воспалительным и антивоспалительным цитокинам отводится важная роль в патогенезе РА. Цитотоксическими эффектами воспалительных цитокинов и, прежде всего фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), обусловлены основные проявления заболевания, в том числе хронический синовит, деструктивные поражения хряща и кости. ИЛ-10 управляет генерацией T_{reg}-клеток, которые супрессируют антигенспецифический Т-клеточный ответ и предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний [136]. Показана существенная роль ТРФ-β в индукции экспрессии Foxp3 $CD4^{+}CD25^{-}$-клетками и приобретении ими супрессорной активности [78]. Вместе с тем, показано, что при РА потеря скелетной мышечной массы ассоциирована с чрезмерной системной продукцией ФНО-α и ТРФ-β [222]. Способность клеток плаценты реализовывать изменение цитокинового профиля при беременности в пользу Т-хелперов 2-го класса, продукция клетками цитотрофобласта супрессорных факторов в виде ТРФ-β и ИЛ-10 служат предпосылками использования этого материала в качестве иммуномодулирующего препарата [66].

Полученные нами данные показали, что при АА уровень ФНО-α коррелировал с величиной ИА ($r = 0,6$, $p = 0,04$) (рис. 54), а между ИА и уровнем ИЛ-10 установлена отрицательная корреляционная связь ($r = –0,7$, $p = 0,03$) [25]. Отрицательная корреляция была также выявлена между уровнем ИЛ-10 и ФНО-α ($r = –0,7$, $p = 0,03$), что

указывает на возможное участие ИЛ-10 в регуляции уровня ФНО-α при АА по механизму обратной связи. Аналогичный механизм взаимодействия представлен T. Tsubaki и соавт. [215] при определении регуляции продукции ИЛ-10 активированными ФНО-α синовиальными макрофагами через активацию ИЛ-10-рецептора в раннем периоде развития РА. Интересно, что корреляция между концентрацией ТРФ-β и ИА отсутствовала. Вместе с тем установлена положительная корреляция уровней ФНО-α и ТРФ-β ($r = 0,7$, $p = 0,02$), что, вероятно, отражает согласованный характер динамики концентрации двух цитокинов, которым свойственна регуляторная функция при РА.

На фоне проявления лечебного действия КП на 14-е сутки установлено достоверное снижение уровня ТРФ-β (рис. 55, А). На 28-е сутки проявление эффекта препаратами КД и КП коррелировало с восстановлением уровня ИЛ-10 до контрольных значений (рис. 55, Б).

Стойкие и глубокие изменения состояния иммунной системы реципиентов после применения СКП не исключают того, что продуцируемые плацентой регуляторные факторы реализуют свою

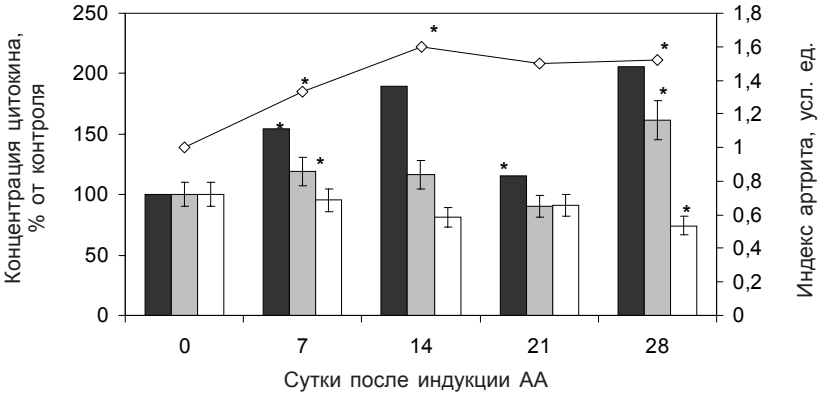


Рис. 54. Индекс артрита и концентрация цитокинов в сыворотке у животных с АА: ■ – ФНО; ▨ – ТФР; □ – ИЛ-10; ⎯ – ИА; * – отличия достоверны по сравнению с контролем.

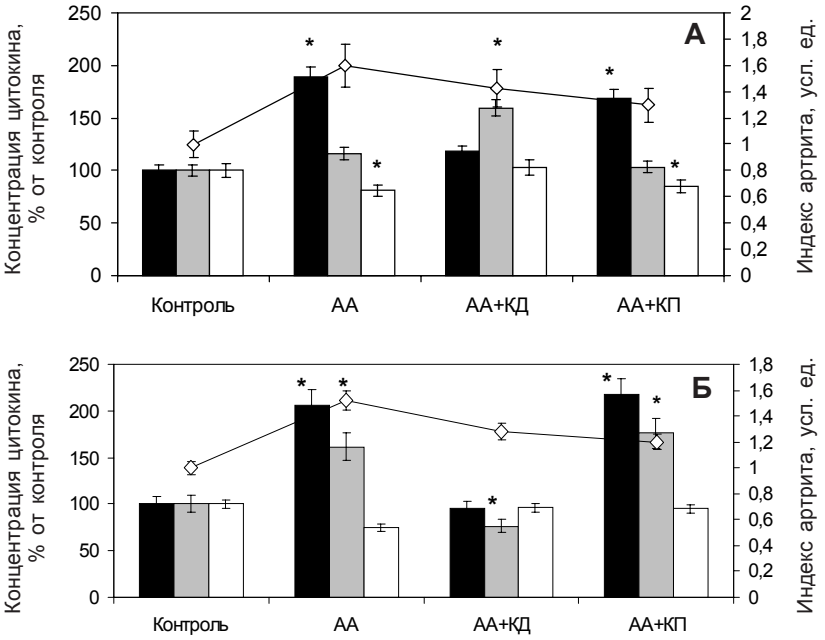


Рис. 55. Индекс артрита и концентрация цитокинов в сыворотке у животных с АА до и после введения СКП: А – 14-е сутки, Б – 28-е сутки: ■ – ФНО; ▒ – ТФР; □ – ИЛ-10; ⎯ – ИА; * – отличия в концентрации цитокинов достоверны по сравнению с контролем (интактными животными).

иммунотропную активность через модуляцию лимфогемопоэтического комплекса на уровне ранних предшественников, а именно, гемопоэтического компартмента КМ. При РА, когда гемопоэтический плацдарм организма находится в условиях существенного дисбаланса цитокинов [38], СКК могут по-разному отвечать на про- и воспалительные цитокины [36], дальнейшее действие которых манифестируется вплоть до индукции генов ранней и поздней фаз пролиферации [97, 111].

Ранее было показано наличие в гомогенате клеток плаценты человека (ГПЧ) регуляторов функционального статуса кроветвор-

ных предшественников – колониеобразующих единиц в селезенке на 8-е и 12-е сутки (КОЕс-8 и КОЕс-12 соответственно) – и установлено, что в отношении малодифференцированных предшественников (КОЕс-12) дозозависимый стимулирующий эффект ГПЧ был более выражен, чем в отношении КОЕс-8 [27]. Следовательно, в плаценте присутствуют стимуляторы роста не только коммитированных кроветворных предшественников, но и менее дифференцированных форм, в частности молекулы регуляции кроветворения, подобные СКФ [56]. Авторы также установили, что стимуляция колониеобразования КМ после введения криоконсервированного ГПЧ (кГПЧ) отличалась от нативного. Было высказано предположение, что при введении кГПЧ в организм реципиента попадают не только имеющиеся в нем наработанные медиаторы, но и клетки, продуцирующие их после трансфузии [28]. Не исключено, что после криоконсервирования часть клеток с такого рода активностью погибает/снижает функциональный потенциал, что и обуславливает снижение лимфогематотропной активности кГПЧ в целом.

Для детального изучения механизма действия вводимой СКП на гемопоэтические предшественники при АА нами была проведена сравнительная оценка влияния нативной и криоконсервированной в разных условиях СКП (нСКП, КД, КП) на состояние популяций клеток $CD34^{+}CD38^{-}$ и $CD117^{+}$ в КМ животных с АА.

Известно, что по мере дифференцировки СКК изменяет свои фенотипические характеристики [147]. Например, принято считать, что клетки с фенотипом $CD34^{+}CD38^{-}$ являются полипотентными СКК, в то время как $CD34^{+}CD38^{+}$-клетки представляют собой более продвинутые в дифференцировке предшественники. Показано, что популяция $CD34^{+}CD38^{-}$ способна дифференцироваться в различные типы клеток (клетки крови, кардиомиоциты, гепатоциты) в зависимости от микроокружения. Именно эти клетки ответственны за длительность приживления КМ [93]. Структура CD117 – характерный маркер как для стволовых, так и коммитированных в миелоидном, эритроидном и мегакариоцитарном направлениях клеток [36] – является рецептором СКФ, после связывания с которым формируется димер СКФ и его рецептор c-kit, который активирует внутриклеточную тирозинкиназу,

фосфорилирующую сигнальные молекулы. Недостаток СКФ и его рецептора приводит к снижению количества СКК и предшественников в КМ [209].

На 14-е сутки развития АА на фоне снижения в 1,2 раза по сравнению с контролем количества клеток в КМ (рис. 56) повышалось содержание более потентных $CD34^+CD38^-$-клеток (рис. 57). Это согласуется с результатами об увеличении в 2,4 раза количества КОЕс-12 в КМ животных с АА [27]. Такого рода изменения могут быть результатом активации процессов пролиферации более потентных предшественников стволового компартмента в ответ на измененный при АА цитокиновый профиль.

Для оценки функционального потенциала СКК нами был использован индекс пролиферативной активности (ИПА), определяемый как отношение процентного содержания менее дифференцированных СКК ($CD34^+CD38^-$) к более дифференцированным ($CD117^+$). На фоне повышения содержания обеих субпопуляций компартмента СКК при АА: $CD34^+CD38^-$-клеток – в 1,7 раза и $CD117^+$-клеток – в 1,3 раза на 14-е сутки (рис. 58) и в 3,8 и 3,6 раза соответственно на 28-е сутки, выраженность этого процесса у более потентных СКК была выше, что подтверждалось и повышением ИПА в 1,3 (14-е сутки) и 1,13 раза (28-е сутки). Данный факт указывает на превалирование в эти сроки пролиферативного потенциала СКК животных с АА. Индекс пролиферативной активности на 28-е сутки снижался по сравнению с 14-ми, что может

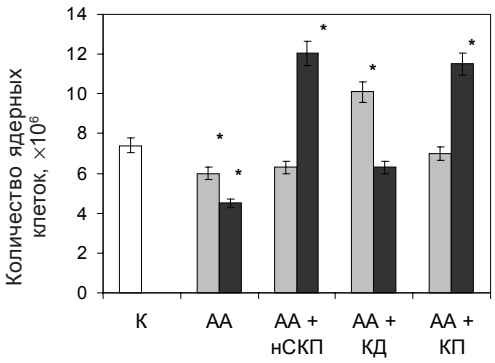


Рис. 56. Количество ядерных клеток в КМ при АА после введения СКП: □ – 14-е сутки; ■ – 28-е сутки; К – контроль; * – отличия достоверны по сравнению с контролем.

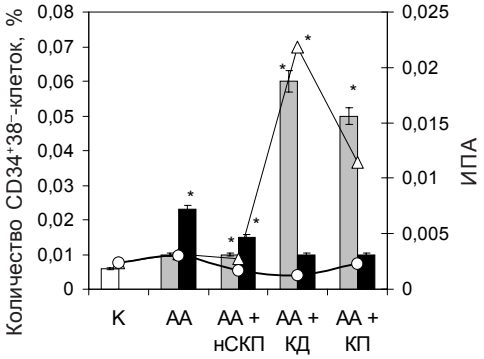


Рис. 57. Количество $CD34^+$ $CD38^-$-клеток, ИПА в КМ у животных с АА до и после введения СКП: ▢ – 14-е сутки; ■ – 28-е сутки; К – контроль; ИПА (%$CD34^+$ $CD38^-$/ %$CD117^+$); △ – ИПА на 14-е сутки; ○ – ИПА на 28-е сутки; * – отличия достоверны по сравнению с контролем.

свидетельствовать о снижении темпов пролиферации и истощении пула клеток. Эти данные подтверждаются снижением количества ядерных клеток в КМ (см. рис. 53).

На 14-е сутки терапевтическое действие оказывала КП, при этом отмечалось повышение количества ядерных клеток в 1,2 раза и относительное содержание $CD117^+$-клеток в 1,7 раза, однако ИПА оставался выше контроля. Отсутствие эффекта после введения КД на 14-е сутки в отличие от нСКП и КП, вероятно, обусловлено разнонаправленным действием суспензий на $CD117^+$-клетки. На

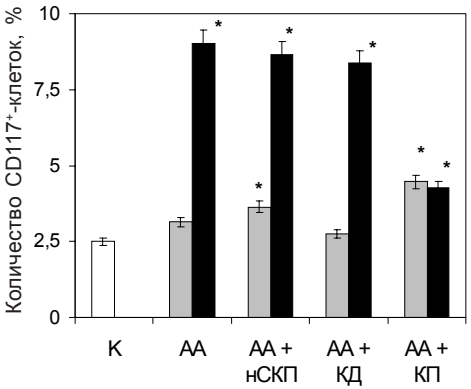


Рис. 58. Количество $CD117^+$-клеток в КМ животных с АА после введения СКП: ▢ – 14-е сутки; ■ – 28-е сутки; К – контроль; * – отличия достоверны по сравнению с контролем.

28-е сутки КД и КП проявляли лечебный эффект. После введения обеих суспензий повышалось количество ядерных клеток в 1,7 и 1,9 раза соответственно. На этом фоне было установлено снижение ИПА в 2,3 (КД) и 1,2 (КП) раза.

Представленные данные свидетельствуют о перераспределении субпопуляционного состава клеток стволового компартмента в гемопоэтическом плацдарме при АА и корригирующем влиянии введения СКП. Очевидно, что изменение фенотипических характеристик СКК являются следствием реаранжировки функционирования их постгеномных каскадов, к которым причастны и, так называемые, stemness гены *oct-4*, *nanog*, *rex1*, *c-myb*, *gata2* и др. [184]. Определение особенностей модификации такого рода внутриклеточных структур кроветворных клеток в условиях развития АА представляет особый интерес. Например, показана возможность использования специфических блокаторов сигналирования c-kit для предотвращения развития индуцированного коллагеном артрита и освобождения ФНО-α тучными клетками, для которых c-kit является существенным маркером развития и активации [97].

В наших исследованиях было показано, что в клетках КМ животных экспрессируется ген *c-kit*. Это подтверждается присутствием ампликонов транскриптов соответствующей матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) в образцах КМ, идентифицированных методом ОТ-ПЦР (рис. 59). На 14-е и 28-е сутки у животных с АА в КМ было отмечено повышение экспрессии этого гена по сравнению с контролем в 1,4 и 3 раза соответственно (рис. 60), что коррелирует с повышением относительного содержания $CD117^{+}$-клеток (см. рис. 57). Согласованность модификации фенотипических характеристик и генной активности в клетках КМ при АА была установлена и после введения нативной или криоконсервированной СКП.

Возможность регуляции состояния гемопоэтических клеток у животных с АА введением СКП, по-видимому, заложена в их биологическом потенциале. Показано существование гемопоэтических кластеров в плаценте, определяемых по экспрессии маркеров CD31, CD34, c-kit, формируемых из аллантоиса и регулируемых эндотелиальными клетками плаценты через СКФ/c-kit сигналирование [195].

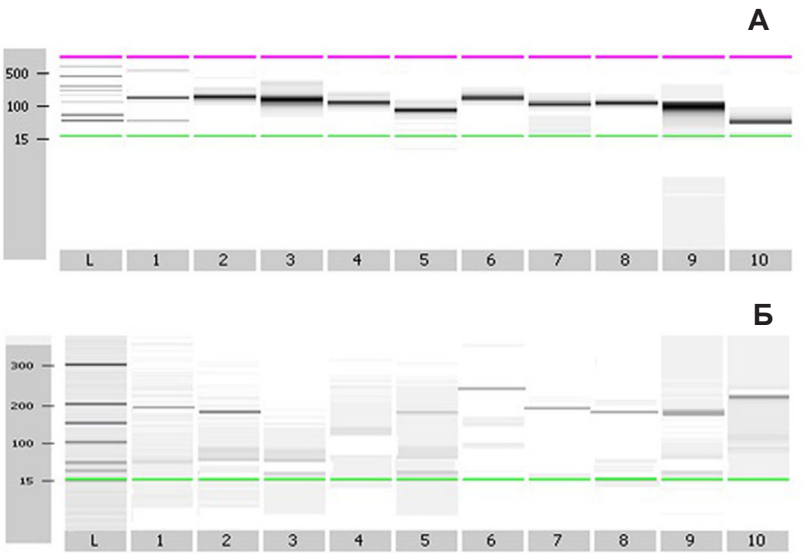


Рис. 59. Фореграмма продуктов амплификации транскриптов гена *c-kit* (дорожки 1–5) и *gata2* (дорожки 6–10) в КМ животных с АА до и после введения клеток: А – 14-е сутки; Б – 28-е сутки. Дорожки: L – маркер длины ампликона; 1, 6 – интактные животные; 2, 7 – АА; 3, 8 – после введения нСКП; 4, 9 – КД; 5, 10 – КП.

Роль белка GATA2 и регуляция экспрессии его гена – *gata2* в гемопоэзе полностью не изучена, но исследования подтверждают экспрессию этого транскрипционного фактора на ранних стадиях гемопоэза несколькими гемопоэтическими линиями. В клетках кордовой крови покоящаяся фракция $CD34^{+}CD38^{-}Hoechst^{lo}$ $PyroninY^{lo}$ экспрессировала больше GATA2, чем циркулирующие клетки [212].

GATA2 является также транскрипционным фактором в цитокиновых сигнальных каскадах. Трансдукция ретровируса, содержащего систему с индукцией экспрессии GATA2 эстрадиолом, в мононуклеарные клетки костного мозга мышей существенно супрессировала цитокинзависимый рост мононуклеаров и выде-

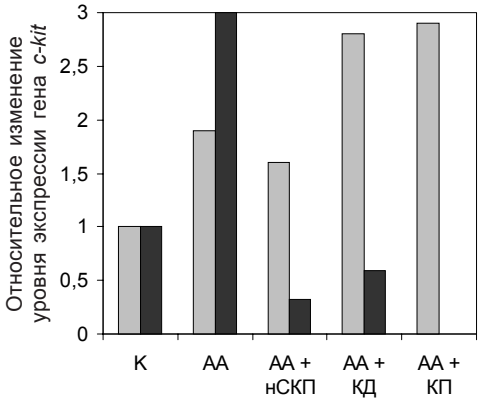


Рис. 60. Изменение уровня экспрессии гена *c-kit* в КМ животных с АА до и после введения СКП на 14-е (□) и 28-е (■) сутки (оценка полуколичественным методом наличия транскриптов в ПЦР при титровании мРНК образцов); К – контроль; уровень экспресии в контроле принят за 1.

ленной популяции стволовых клеток Sca-1$^+$Lin$^-$ [111]. Этим, вероятно, можно объяснить наблюдаемое нами снижение содержания клеток в КМ при АА (см. рис. 52) на фоне повышения экспрессии гена *gata2* по сравнению с контролем. Повышенная экспрессия гена *gata2* в КМ наблюдалась у животных после введения КД и КП на 14-е и 28-е сутки (рис. 61).

Проявление лечебного эффекта КД и КП в отношении гемопоэтического звена при АА обусловлено изменением пролиферативной активности клеток КМ, что проявляется в снижении содержания CD34$^+$CD38$^-$ и ИПА. CD117 является мишенью действия СКП при АА, что подтверждается регуляцией пула CD117$^+$-клеток и уровня экспрессии гена *c-kit*. Различия в проявлении функциональной активности КД и КП на 14-е сутки развития АА обусловлены повышением количества CD117$^+$-клеток после применения КП.

Полученные результаты являются экспериментальным подтверждением иммуно- и гематотропного потенциала криоконсервированных клеток плаценты при АА. Выбор условий криоконсервирования СКП определяет ее способность проявлять различную функциональную активность в отношении кроветворных предшественников и зрелых ИКК.

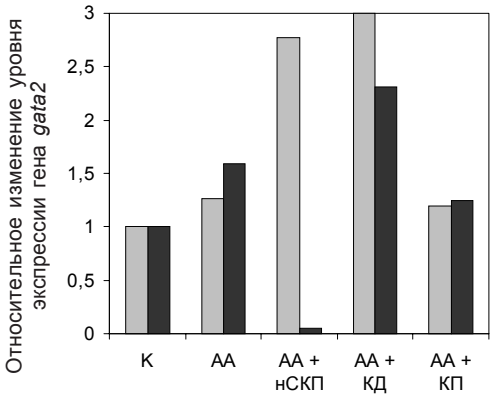


Рис. 61. Изменение уровня экспрессии гена *gata2* в КМ животных с АА до и после введения СКП на 14-е (□) и 28-е (■) сутки (оценка полуколичественным методом наличия транскриптов в ПЦР при титровании мРНК образцов); К – контроль; уровень экспресии в контроле принят за 1.

2.3. Лечение нейродегенеративных заболеваний аутоиммунной природы клетками фетального мозга

Обоснованием использования ФНК как метода клеточной терапии при лечении нейродегенеративных заболеваний аутоиммунной природы послужили данные о высокой пластичности* нейроткани [220]. Ранее установлено [103], что в состав ФНК крыс 11 суток гестации входят как мультипотентные СК, так и мигрирующие постмитотические нейробласты, обладающие мощным пролиферативным потенциалом, позволяющим их использование с целью заместительной терапии. Кроме того, ФНК продуцируют большое количество различных биологически активных веществ таких, как цитокины, нейромедиаторы, гормоны, ростовые и другие факторы, способные обеспечивать их выживание и стимулировать регенерацию поврежденных тканей реципиента [44, 156]. Однако имеющийся как негативный [1], так и позитивный опыт трансплантации ФНК пациентам с аутоиммунной патологией [54] делает актуальным изучение механизмов действия вводимого фетального

*Пластичность – свойство клеток стволового компартмента давать рост более дифференцированным нетканеспецифичным предшественникам в зависимости от регуляторных сигналов микроокружения.

материала. Очевидно, что успех реализации нейротрофической и интегральной регуляторной активности применяемых ФНК может определяться как исходным их состоянием, так и фазой развития иммуновоспалительной реакции [15].

Далее представлены результаты экспериментальных исследований, в которых оценена способность криоконсервированных ФНК (кФНК) реализовывать терапевтический потенциал в модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) – аналога рассеянного склероза (РС) человека. Для индукции ЭАЭ [41] использовали гомогенат гомологичной спиномозговой ткани (50 мг) с полным адъювантом Фрейнда, содержащим 2–4 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis*. Животные были разделены на группы, которым на 7-е и 14-е сутки развития ЭАЭ внутрибрюшинно вводили нФНК, ФНК, криоконсервированные по режиму I (кФНК-PI), взрослые нервные клетки (ВНК) в дозе 5×10^6 клеток на 100 г веса животного.

Как известно, ведущая роль в развитии иммуновоспалительного процесса при ЭАЭ отводится реакциям клеточного иммунитета, которые реализуются на фоне изменяющихся кооперативных взаимодействий отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов с вовлечением в патологический процесс системы ЕК-клеток [121]. Установлено, что на протяжении всего срока наблюдения у животных с ЭАЭ имело место явно выраженное дисрегуляторное состояние иммунокомпетентной сферы (рис. 62), которое характеризует развитие многих АИЗ, включая РС [118].

Введение ФНК оказывало существенное влияние на клеточно-опосредованные реакции иммунного ответа животных с ЭАЭ, причем эффективность такого рода терапии определялась как видом, так и сроком введения материала. Так, к 21-м суткам ЭАЭ действие кФНК-PI [80] в отношении нормализации концентрации регуляторных Т-хелперов и Т-супрессоров было сходным как при введении фетального материала на 7-е, так и на 14-е сутки патологии (рис. 62). Исходя из значимости иммунорегуляторного индекса (ИРИ), нативные ФНК (нФНК) при их введении на 7-е сутки животным с ЭАЭ практически не проявляли корригирующего эффекта (рис. 62, А), а на 14-е сутки – он был минимальным (рис. 62, Б).

Введение препаратов по-разному влияло и на коррекцию повышенного функционального статуса ЕК-клеток, оцененного по индексу цитотоксичности (ИЦ) мононуклеаров селезенки в отношении эритроцитов кур. Установлено, что данный показатель снижался при введении нФНК и в большей степени кФНК на 14-е сутки патологии. В связи с этим необходимо подчеркнуть, что активность ЕК соподчинена функции Т-супрессоров [13], концентрация которых была высокой также при введении ФНК на 14-е сутки.

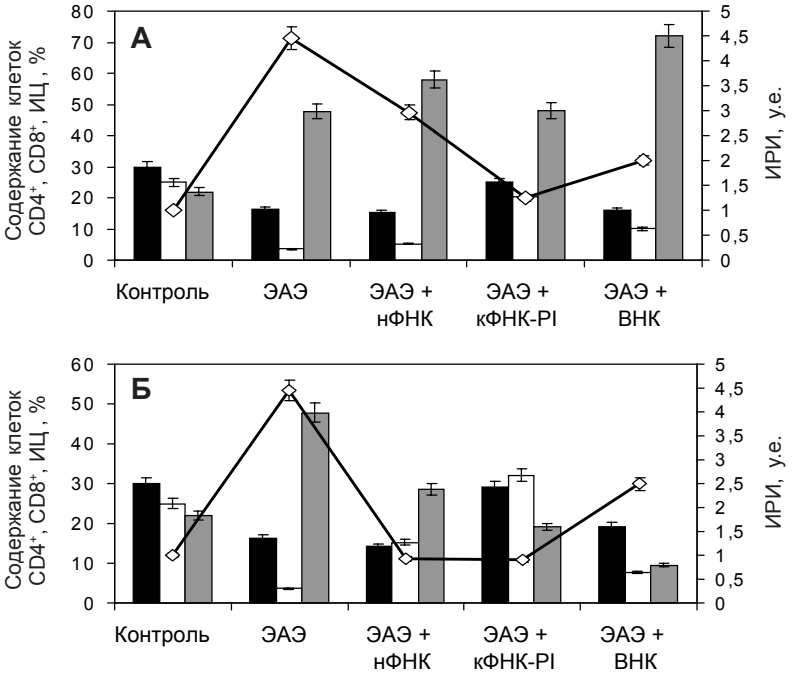


Рис. 62. Содержание клеток $CD4^+$ (■), $CD8^+$ (□), ИРИ (——) – соотношение CD4/CD8 и индекс цитотоксичности (ИЦ, ▨) мононуклеаров в селезенке крыс с ЭАЭ на 21 сутки ЭАЭ до и после введения ФНК на 7-е сутки (А) и на 14-е сутки (Б) развития патологии.

На сегодняшний день причина возникновения РС точно не выяснена, поэтому отсутствуют методические подходы ранней его диагностики. Известно, что отмена естественной иммунологической толерантности и появление аутореактивных клонов к мозговым антигенам у больных РС отмечаются уже на доклинической стадии развития патологического процесса [192]. Формирование антигенраспознающего рецепторного фенотипа Т-клеток происходит при тесном контакте незрелых тимоцитов с клетками стромы тимуса, презентирующих тканеспецифические, в том числе и мозговые антигены [196]. Логично, что оценка степени сенсибилизации ИКК к антигенным структурам нервных клеток может быть критерием оценки развития нейродегенеративной патологии аутоиммунного генеза, а также эффективности проводимой в том или ином виде терапии [7, 32]. В качестве такой тест-системы возможно использование культуры нервных клеток с внесением ИКК, полученных от животных с ЭАЭ.

В табл. 3 представлены данные оценки степени специфической сенсибилизации лимфоцитов животных с ЭАЭ к нервным клеткам, которую определяли по разнице между количеством внесенных спленоцитов и снятых после окончания периода инкубации с культурой ФНК 15 суток гестации [32].

На рис. 63 видно, что способность лимфоцитов животных с ЭАЭ агрегировать с культурой ФНК была в 5 раза выше, чем у здоровых животных. Это свидетельствует о высокой степени сенсибилизации ИКК крыс с ЭАЭ на пике клинической манифестации заболевания.

Установлено, что введение как нативных, так и криоконсервированных ФНК приводило к снижению содержания ИКК, контактно взаимодействующих с культурой ФНК, проявляя десенсибилизирующий эффект. Важно, что такая активность была присуща именно фетальному материалу, так как ВНК даже увеличивали степень сенсибилизации ИКК ((49,2 ± 5,1)%) (рис. 64, табл. 3), то есть способствовали аггравации иммуновоспалительного процесса. Важно, что эффект от применения ФНК зависел от срока введения. Очевидно, что более выраженное снижение показателя наблюдалось при трансплантации ФНК на 14-е сутки. К тому же кФНК-PI

Таблица 3. Показатели степени сенсибилизации ИКК селезенки животных с ЭАЭ (21 сутки) к нервным клеткам крыс в культуре *in vitro* до и после введения ФНК

Группы	Количество спленоцитов $\times 10^6$ кл/мл, не агрегировавших с нервными клетками (АК, %)	
	Введение на 7-е сутки	Введение на 14-е сутки
Контроль	14,29 ± 0,63	9,21 ± 0,12
ЭАЭ (21-е сутки)	57,13 ± 1,19	45,12 ± 4,86
ЭАЭ + нФНК	35,75 ± 0,76	25,71 ± 0,48
ЭАЭ + кФНК-PI	28,56 ± 0,17	21,43 ± 0,36
ЭАЭ + ВНК	71,43 ± 2,34	49,21 ± 1,14

имели в этом плане преимущество (степень снижения в 2,7 раза по сравнению с контролем) перед нФНК (снижение в 2,2 раза) (табл. 3).

Объяснением подобного рода активности ФНК может быть конкурентное связывание с сенсибилизированными ИКК низких доз основного белка миелина (ОБМ), находящегося во вводимом материале. Элиминация аутоагрессивных Т-лимфоцитов путем связывания их с микродозами вводимого антигена осуществляется по типу конкурентного взаимодействия [14]. Микродозы вводимого миелина в составе ФНК вытесняют собственный ОБМ из связи с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) II класса на антигенпрезентирующих клетках [39]. Таким образом, экзогенный миелин играет роль «ложной мишени» и запускает каскад иммунологических реакций, в результате которых возникает популяция специфичных к экзогенному миелину Т-супрессорных клеток. Они секретируют противовоспалительные цитокины и перекрестно реагируют с собственным ОБМ. В участках

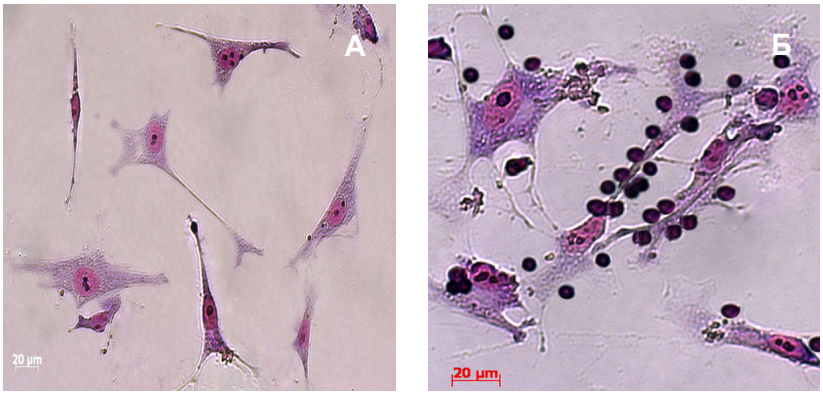


Рис. 63. Характер взаимодействия с нервными клетками спленоцитов здоровых животных (А) и животных с развитием ЭАЭ на 21-е сутки (Б).

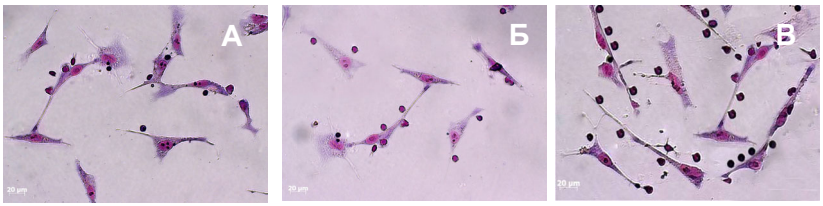


Рис. 64. Характер взаимодействия нервных клеток и спленоцитов животных с ЭАЭ после введения ФНК нативных и криоконсервированных с использованием разных режимов: А – нФНК; Б – кФНК-PI; В – ВНК.

воспаления в мозге Т-супрессорные клетки реактивируются ОБМ организма реципиента, что приводит к выработке противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ТРФ-β) [121]. Они, в свою очередь, уменьшают локальное воспаление путем подавления Т-клеточного ответа [32]. Подобный механизм терапевтического действия при лечении РС проявляет фармацевтический препарат «Копаксон-Тева», основным действующим веществом которого является синтетический ацетат глатирамера, по своему химическому строению сходный с ОБМ [116].

Тяжесть клинической картины заболевания как интегральный показатель эффективности терапии ФНК оценивали по следующей шкале [43]: 1+ – сниженный тонус хвоста; 2+ – слабость или легкий паралич задних конечностей; 3+ – тяжелый паралич задних или всех конечностей; 4+ – предсмертное состояние; 5+ – смерть. Необходимо отметить большую эффективность применения ФНК на 14-е сутки иммуновоспалительного процесса в виде ЭАЭ (рис. 65, Б). При введении кФНК и нФНК в доклиническую фазу развития патологии (7 сутки) было отмечено первичное ухудшение клинического состояния животных (рис. 65, А), а при введении ВНК – смертельные исходы у 20% реципиентов и выраженную аггравацию неврологических симптомов до 3,5–4 баллов у выживших животных.

Результаты подобного рода терапии определяются рядом условий, например фазой развития иммуновоспалительной реакции, которая на 14-е сутки может иметь более благоприятный цитокиновый профиль для проведения терапевтических манипуляций. Особую значимость имеют результаты проявления более выраженного позитивного эффекта кФНК, что может быть связано с модификацией иммуногенных характеристик нервных клеток после криоконсервирования [129].

Возможность изменения иммунокорригирующего потенциала ФНК после криоселекции определенных клеточных популяций была апробирована на моделе ЭАЭ в ходе наших дальнейших исследований, в которых использовали два режима криоконсервирования – PI и PIII (протокол замораживания описан ранее в этой же главе на стр. 506). Особое значение в патогенезе РС и ЭАЭ имеют T_{reg}-клетки [177]. Именно на коррекцию функционального состояния этих клеток пациентов с данной патологией должна быть направлена терапия. Получено достаточное количество данных, свидетельствующих о снижении как количества, так и функциональной активности индуцированных T_{reg}-клеток в периферической крови при ЭАЭ [101]. X. Chen и соавт. [99] указывали, что причинами нарушения формирования индуцированных T_{reg}-клеток могут быть изменение состояния тимуса и генерация в нем натуральных T_{reg}-клеток.

Для идентификации натуральных T_{reg}-клеток тимуса в большинстве случаев используют метод двойного маркирования по CD4- и CD25-структурам [190]. Результаты проведенных нами исследований, а также данные литературы [225] свидетельствуют о том, что около 95% $CD4^+CD25^+$ – тимических клеток экспрессируют белок FOXP3 и продуцируют супрессорные медиаторы ТРФ-β

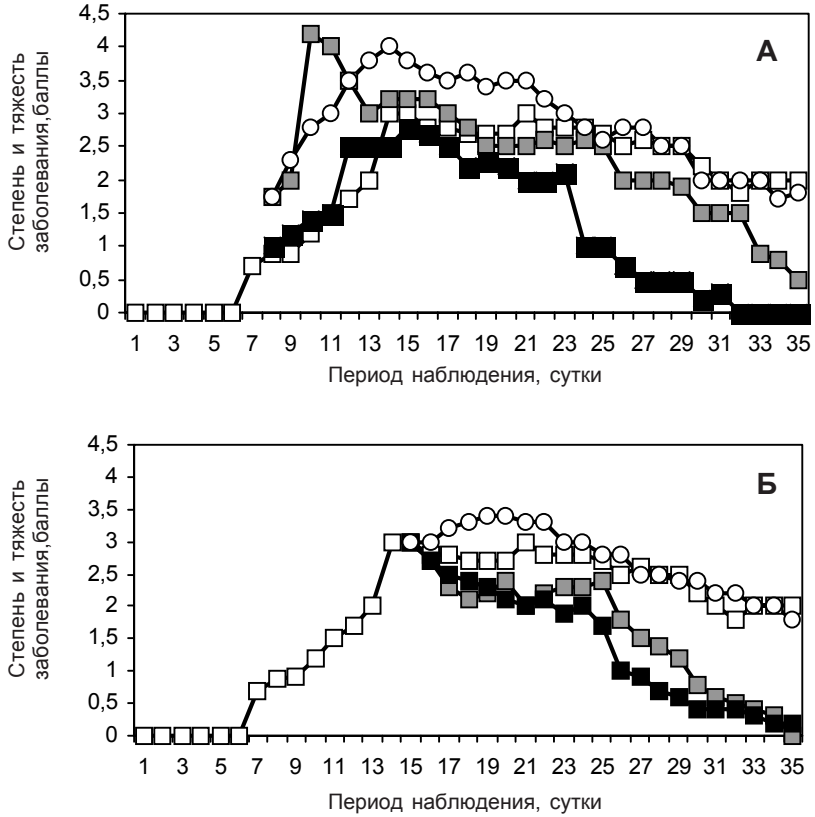


Рис. 65. Динамика изменения степени тяжести ЭАЭ до и после введения ФНК на 7-е (А) и на 14-е сутки (Б) ЭАЭ: □ – течение ЭАЭ; ▨ – введение нФНК; ■ – введение кФНК-PI; ○ – введение ВНК.

и ИЛ-10, то есть $CD4^+CD25^+$ – тимические клетки обладают супрессорной функцией и являются натуральными T_{reg}-клетками. Периферические T_{reg}-клетки отличаются повышенной экспрессией CD25-маркера ($CD4^+CD25^{hi}$) и только им присуща супрессорная активность [120].

В динамике развития ЭАЭ отмечено достоверное снижение содержания $CD4^+CD25^+$-клеток в тимусе на 7-е сутки, которое свидетельствует о нарушении формирования данного пула клеток уже на начальных этапах развития патологии (рис. 66). Подобная тенденция снижения количества T_{reg}-клеток при развитии ЭАЭ была отмечена в этот срок и на периферии (рис. 67), что совпадает с данными, полученными ранее [101]. По мнению Watanabe N. и соавт. [223], причиной этого может быть нарушение продукции тимусного стромального лимфопоэтина (ТСЛП), влияющего на формирование T_{reg}-клеток. Не исключаются также нарушения в различных костимуляторных сигнальных каскадах, опосредованных молекулами CD28, CD154, ИЛ-2R, ТСЛП-R, GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene), STAT5 (signal transducer and activator of transcription), которые также могут нарушать формирование натуральных T_{reg}-клеток [90].

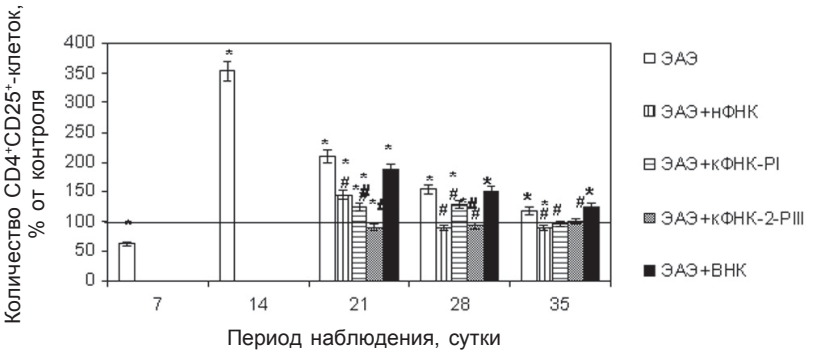


Рис. 66. Содержание $CD4^+CD25^+$-клеток в тимусе при ЭАЭ до и после лечения ФНК; показатели здоровых животных (контроль) приняты за 100%; *, # – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и ЭАЭ соответственно.

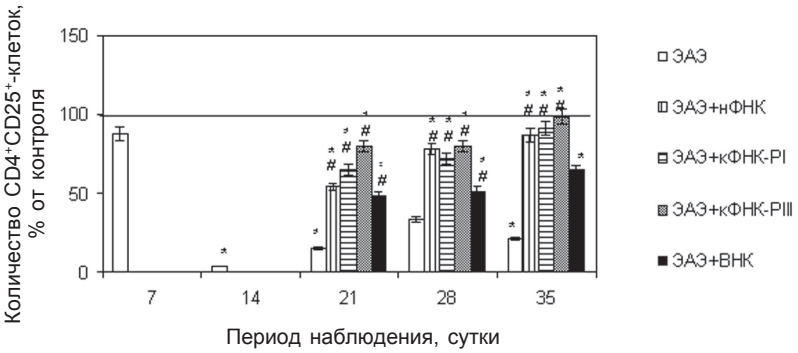


Рис. 67. Содержание $CD4^+CD25^+$-клеток в периферической крови крыс при ЭАЭ до и после лечения ФНК; показатели здоровых животных (контроль) приняты за 100%; *, # – различия статистически достоверны ($p<0,05$) по сравнению с контролем и ЭАЭ соответственно.

Установлено, что количество $CD4^+CD25^+$-клеток существенно повышалось на 14-е сутки развития патологии (рис. 66), тогда как на периферии еще больше снижалось (рис. 67). Это совпадает с данными Weinreich M.A.и соавт. [225] о нарушении экспорта тимоцитов при ЭАЭ, обусловленного «запретом» выхода на периферию незрелых Т-клеток. Как известно, мигрировать на периферию могут только зрелые тимоциты, имеющие фенотип $Qa\text{-}2^{high}CD62L^{high}HSA^{low}CD69^{low}$ [155]. Снижение уровня экспрессии CD69-маркера обусловлено повышением содержания его антагониста S1P (sphingosine-1-phosphate), которому присуща цензорная функция эмиграции тимоцитов. На фоне развития ЭАЭ экспрессия S1P существенно снижается [171]. В свою очередь, экспрессию S1P и соответственно тимическую эмиграцию контролирует транскрипционный фактор KLF2 (Kruppel-like factor 2) [225], то есть причиной нарушения эмиграции натуральных T_{reg}-клеток может быть отсутствие либо низкий уровень транскрипции фактора KLF2.

Несмотря на то, что к 35-м суткам количество $CD4^+CD25^+$-клеток в тимусе приближалось к аналогичным у здоровых животных (см. рис. 66), в периферической крови оно было существенно ниже контроля (рис. 67).

Через 7 суток после введения животным с ЭАЭ криоконсервированных ФНК (21-е сутки ЭАЭ) количество $CD4^+CD25^+$-клеток в тимусе существенно снизилось по сравнению с животными, не получавшими лечения, причем степень такого снижения определялась режимом замораживания. Так, после введения кФНК-PIII их уровень достигал контрольных значений (см. рис. 66). Данный факт может быть объяснен гармонизацией внутритимического профиля регуляторных медиаторов под влиянием продуцируемых ФНК биоактивных субстанций, а также восстановлением экспортной функции тимуса за счет повышения экспрессии упоминаемого выше S1P, имеющего непосредственное отношение к этому процессу [225]. Подтверждением этому является повышение содержания T_{reg}-клеток в периферической крови, где они непосредственно реализуют свое супрессорное действие [120]. Как видно на рис. 66, эффект был присущ именно фетальному материалу, так как ВНК не оказывали подобного действия.

Как в тимусе, так и в периферической крови содержание T_{reg}-клеток в большей степени восстанавливалось в группе животных с введением кФНК-PIII. Преимущество криоконсервированного материала при формировании T_{reg}-клеток может быть обусловлено усилением синтеза белков теплового шока в ФНК после отогрева [9, 69].

Точный ответ, каким образом ФНК могут влиять на T_{reg}-клетки, пока не получен. Известно, что к этому процессу на периферии имеют прямое или опосредованное отношение такие медиаторы, как ИЛ-10, ТРФ-β и ИФН-γ [101]. Кроме того, доказано, что наличие хемокиновых рецепторов (CCR3, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR3, CCR4, CCR5 и CXCR4) на мембране ФНК определяет миграцию этих клеток в тимус [141]. Способность продуцировать нейротрофические факторы (NGF, BDNF, FGF-7, FGF-10, NT-3), широкий спектр цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-1rα, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ -6, ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО-α, интерфероны, M-CSF, CSF-1, ТРФ-β) [91] определяет возможность влияния ФНК на процессы полноценной дифференцировки и миграционные свойства тимических T_{reg}-клеток [92, 134, 235].

Подтверждением того, что T_{reg}-клетки тимуса могут быть мишенью терапевтической активности ФНК, является положительная динамика изменения их содержания непосредственно в тимусе

(см. рис. 66), и, как следствие, уменьшение клинических признаков патологии (рис. 68), которые наиболее выражены после введения кФНК-PIII. Важно, что именно этот материал начинал действовать раньше других и максимально минимизировал признаки ЭАЭ. Это можно объяснить тем, что криоконсервирование в соответствии с определенными режимами может селективно влиять на популяционный состав ФНК и изменять при этом спектр продуцируемых ими медиаторов [14, 16]. Так, выше было показано, что PIII обеспечивал повышение относительного содержания стволовых клеток за счет гибели более дифференцированных предшественников нейронов. Возможно, именно за счет сохранности мультипотентных клеток в кФНК-PIII реализуется более выраженный терапевтический эффект (рис. 68).

Таким образом, клиническая манифестация ЭАЭ (14–21-е сутки) сопровождается увеличением содержания натуральных T_{reg}-клеток в тимусе и снижением содержания клеток $CD4^+CD25^{hi}$ в периферической крови. Введение ФНК оказывало корригирующий эффект – нормализация содержания $CD4^+CD25^+$-клеток в тимусе, повышение $CD4^+CD25^{hi}$-клеток в периферической крови и мини-

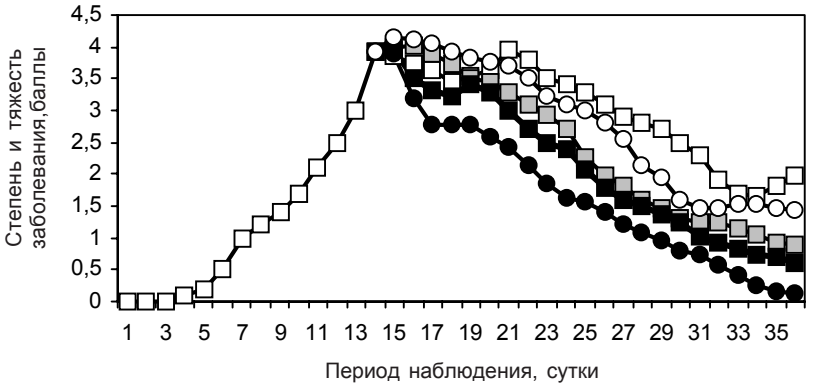


Рис. 68. Клинические признаки ЭАЭ до и после лечения ФНК: □ – течение ЭАЭ; ▒ – введение нФНК; ■ – введение кФНК-PI; ● – введение кФНК-PIII; ○ – введение ВНК.

мизация проявления клинических признаков ЭАЭ в более ранние сроки.

Итак, проблема создания запасов фетального материала, в частности ФНК, используемого для лечения нейродегенеративных и травматических повреждений нервной системы до настоящего времени остается актуальной. Полученные данные имеют важное значение в определении оптимального режима криоконсервирования, сроков введения терапевтического материала, а также методов оценки иммунорегуляторного статуса кФНК. Доказано, что кФНК являются надсистемными регуляторами, обладающими иммуномодулирующей активностью, которая выражалась в коррекции разбалансированного при ЭАЭ общего супрессорного звена иммунитета. Продемонстрировано, что терапевтические подходы при ЭАЭ должны быть направлены на коррекцию содержания тимических T_{reg}-клеток как основного компонента, формирующего естественную толерантность. Данный тезис является приоритетным при коррекции многих патологий аутоиммунного генеза.

Представленные результаты являются предпосылкой возможности использования криоконсервированных ПФПК при лечении патологий аутоиммунного генеза в эксперименте.

При индукции экспериментальных моделей АИЗ (адъювантный артрит, экспериментальный аллергическмй энцефаломиелит, болезнь «трансплантат против хозяина», генетически предрасположенная онкопатология) достигнуто их стабильное воспроизведение. На основании результатов клинических и лабораторных исследований обобщены и проанализированы закономерности возникновения и динамики развития различных форм АИЗ. Получена информация, позволившая проследить как общие механизмы развития многопрофильного патофиологического процесса, так и особенности влияния на него широкого спектра применяемых ПФПК. Результаты экспериментальных исследований, представленные в этой главе, являются основополагающими для подтверждения состоятельности такой терапии. Не вызывает сомне-

ния, что расшифровка механизма действия ПФПК – ключевой момент совершенствования и повышения эффективности их применения в комплексной терапии АИЗ, а также установления особенностей лечения разных их видов. Очевидно также, что с помощью криоконсервирования открываются перспективы управления терапевтическим потенциалом ПФПК, применяемых для лечения различных форм аутоиммунных патологий.

.

Литература

1. Аникин А.Ю., Древаль О.Н., Акатов О.В. и др. Состояние проблемы применения нейротрансплантационных технологий в клинике // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 126, прил. 1. – С. 32–36.
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. Бельский Ю.П., Данилец М.Г., Бельская Н.В. и др. Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях клеток эмбриональной печени // Бюл. СО РАМН. – 2005. – Т. 116, №2. – С. 75–78.
5. Бендюг Г.Д., Гриневич Ю.Я., Смикодуб О.І., та ін. Вплив трансплантації клітин ембріональної печінки на деякі показники, що характеризують стан імунної системи онкологічних хворих в динаміці протипухлинного лікування // Міжвідом. зб. «Гематологія і переливання крові». – К.: Нора-Прінт, 1998. – Вип. 29. – С. 214–220.
6. Березин В.А. Молекулы клеточной адгезии нервной ткани // Успехи совр. биологии. – 1986. – Т. 101. – С. 54–68.
7. Божкова В.П., Брежестовский П.Д., Буравлев В.П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. – М.: Наука, 1988. –318 с.
8. Бондарович Н.А., Якимович О.В., Останков М.В., Сироус М.А. Модулирующее влияние клеток эмбриональной печени на показатели иммунной системы мышей с онкопатологией в разные возрастные периоды их индивидуального развития // Тези доп. VI конференції молодих онкологів України «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології». – К., 2003. – С. 6.
9. Быковская С.Н., Насонов Е.Л. Т-регуляторные клетки при аутоиммунных ревматических заболеваниях // Вестник российской академии медицинских наук. – 2006. – №9-10. – С. 74–81.
10. Вильчевская Е.В., Тютюнник В.В. Оценка экспрессии CD45 при анализе популяции бластных клеток у детей с острыми лейкозами // Онкология. – 2008. – Т. 10, №4. – С. 389–392.
11. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис. … д. м. н. – Харьков, 1988. – 35 с.
12. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Проблемы мед. науки та освіти. – 2000. – №1. – С. 22–37.
13. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н. Обоснование возможности использования эмбриональных нервных клеток при лечении органоспецифических аутоиммунных заболеваний // Проблемы криобиологии. – 2003. – №2. – С. 49–61.

14. Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. та ін. Вивчення функціональної активності кріоконсервованих ембріональних нервових клітин щурів в системі in vitro та in vivo // Трансплантологія. – 2004. – Т. 6, №2. – С. 46–56.
15. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Сироус М.А. и др. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как модельная патология изучения корригирующей активности эмбриональных нервных клеток // Імунологія та алергологія. – 2005. – №3. – С. 76–77.
16. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Сироус М.А. и др. Эмбриональные нервные клетки как источник стволовых элементов в лечении экспериментальных аутоиммунных патологий нейродегенеративной природы // Материалы первого интернационального конгресса «Достижения нейронауки для современной медицины и психологии». – Судак, 2005. – С. 64–66.
17. Гольцев А.М., Бондарович М.О., Останков М.В. та ін. Вплив клітин ембріональної печінки на стан лімфогемопоетичної системи при онкопатології // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т. 3, №2, Ч. 2. – С. 366–368.
18. Гольцев А.Н., Грищенко В.И., Рассоха И.В. и др. Возможность использования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях // Проблемы криобиологии. – 2003. – №4. – С. 41–49.
19. Гольцев А.Н., Гурина Т.М., Бабенко Т.Н., Останков М.В. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // Проблемы криобиологии. – 2003. – №1. – С. 46–50.
20. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г, Гаевская Ю.А. и др. Криобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – №1, 2. – С. 46–51.
21. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени // Проблемы криобиологии. – 2000. – №1. – С. 10–21.
22. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д. и др. Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени разных сроков гестации в условиях развития экспериментальной модели реакции «трансплантат против хозяина» // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 82–86.
23. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С.186–199.
24. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д. Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток // Проблемы криобиологии. – 1994. – №1. – С. 3–13.
25. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останков М.В., Бондарович Н.А. Оценка цитокинового профиля при адъювантном артрите после применения криоконсервированных клеток плаценты // Патологія. – 2011. – Т. 8, №2. – С. 99–102.
26. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Проблемы криобиологии. – 1996. – №2. – С. 3–10.
27. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г. и др. Состояние стволового гемопоэтического компартмента на разных этапах развития адъювантного артрита // Світ медицини та біології. – 2009. – №2. – С. 73–80.
28. Гольцев А.Н. Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Ответ лимфогемопоэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Проблемы криобиологии. – 2000. – №2. – С. 15–30.
29. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д. и др. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Проблемы криобиологии. – 1993. – №4. – С. 34–39.

30. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю., Дубрава Т.Г. Криоконсервированный аллогенный костный мозг – новая мишень иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 313–315.
31. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю. и др. Применение клеток фетальной печени в терапии болезни «трансплантат против хозяина» в эксперименте // Материалы Всерос. конференции с международным участием «Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток». – Самара, 2008. – С. 245–247.
32. Гольцев А.Н., Порожан Е.А., Бабенко Н.Н., Дубрава Т.Г. Степень сенсибилизации иммунокомпетентных клеток как критерий оценки эффективности применения криоконсервированных фетальных нервных клеток при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите // Нейрофизиология. – 2012. – №4. – С. 67– 74.
33. Гольцев А.Н., Рассоха И.В. Перспективы использования препаратов плаценты как модуляторов апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях // Зб. наук. праць наук.-практ. конференції «Сучасні аспекти репродуктології, перинатальної медицини та кріобіології"». – Харків, 2003. – С. 24.
34. Гольцев А.Н., Сафранчук О.В., Бондарович Н.А. и др. Влияние факторов криоконсервирования на уровень экспрессии маркеров стволовых раковых клеток в аденокарциноме Эрлиха // Биол. вестник. – 2009. – Т. 13, №1, 2. – С. 13–16.
35. Гольцев А.Н., Ямпольская Е.Е., Дубрава Т.Г. Идентификация фенотипических характеристик и оценка влияния различных режимов криоконсервирования на функциональный потенциал клеток фетальной печени // Вестник ХНУ. Серия «Биология». – 2006. – Вып. 4, №748. – С.121–127.
36. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Субпопуляции трансплантируемых стволовых кроветворных клеток // Совр. онкология. – 2006. – Т. 8, №1. – С. 1–16.
37. Гриневич Ю.А., Храновская Н.Н., Бундюг Г.Д. Влияние клеток эмбриональной печени на естественную противоопухолевую резистентность организма // Иммунология. – 2003. – №3. – С. 153–157.
38. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. – 2002. – №2. – С. 54–84.
39. Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как возможная модель изучения механизма действия продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса при лечении аутоиммунных заболеваний // Проблемы криобиологии. – 2002. – №2. – С. 34–43.
40. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. – К.: Наук. думка, 1988. – 189 с.
41. Давыдова Г.С. Применение адъюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс // Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике. – Минск: Наука и техника, 1969. – С. 32–37.
42. Дудич Е.И., Семенкова Л.Н., Дудич И.В. и др. Изучение процесса апоптоза раковых клеток индуцированного α-фетопротеином // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, №12. – С. 604–612.
43. Жаботинский Ю.М., Иоффе В.И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. – Ленинград: Медицина, 1975. – 150 с.
44. Иммунная система головного мозга / Под ред. Н.И. Лисяного.– Киев, 1999. – 216 с.
45. Козлов В.А., Ярилин А.А., Аметов А.С. и др. Естественные регуляторные Т-клетки и связанные с ними цитокины при хроническом аутоиммунном тиреоидите // Иммунология и клин. иммунология. – 2007. – Т. 27, №3. – С. 176–188.
46. Козлова Ю.А., Гольцев А.Н., Останков М.В. Влияние изолированных физико-химических факторов криоконсервирования на клетки костного мозга с различным исходным структурно-функциональным статусом // Проблемы криобиологии. – 2003. – №4. – С. 3–11.

47. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1983. – 240 с.
48. Кругляков П.В., Соколова И.Б., Полынцев Д.Г. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма // Цитология. – 2008. – Т. 50, №7. – С. 557–567.
49. Кудрина Г.П., Алтынбаева Р.Ф., Буров Ю.В. Методрекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. – М., 1992. – 39 с.
50. Лемехов В.Г. Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи // Практическая онкология. – 2001. – Т. 8, №4. – С. 3–11.
51. Луценко Е.Д. Популяционный состав и функциональный потенциал клеток плаценты, криоконсервированной в различных режимах // Світ медицини та біології. – 2009. – №3. – С. 105–109.
52. Луценко Е.Д., Гольцев А.Н. Мониторинг состояния пула Т-регуляторных клеток при адъювантном артрите после применения криоконсервированных клеток плаценты // Матеріали XXVII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ліки людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів». – Харків: Видавництво НФаУ, 2010. – С. 325–333.
53. Малышев И.Ю., Круглов С.В., Бахтина Л.Ю. и др. Стресс-ответ и апоптоз в про- и антивоспалительном фенотипе макрофагов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2004. – Т. 138, №8. – С. 162–165.
54. Миронов И. Н., Бугаев В.С., Миронов Н.В., Сухих Г.Т. Терапия рассеянного склероза (новые аспекты) // Клинический вестн. – 1998. – №3. – С. 23–25.
55. Молекулярная клиническая диагностика / Под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
56. Натан Д.Г., Зифф К.А. Регуляция кроветворения // Гематология и трансфузиология. – 1994. – Т. 39, №2. – С. 3–10.
57. Останков М.В., Бондарович Н.А., Рассоха И.В., Гольцев А.Н. Характер изменения структурно-функциональных характеристик клеток фетальной печени после криоконсервирования в зависимости от их сроков гестации // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 302–305.
58. Останков М.В., Лебединец Д. В., Порожан Е.А., Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на цитоморфологические и структурные характеристики фетальных нервных клеток // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №4. – С. 431–438.
59. Пинегин Б.В., Карсонова М.И. Макрофаги: свойства и функции // Иммунология. – 2009. – №4. – С. 241–249.
60. Поповская Т.Н. Современные представления о роли иммунных реакций в развитии злокачественной опухоли // Международ. мед. журнал. – 2008. – №4. – С. 124–127.
61. Рассоха І.В. Вплив кріоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу на процеси апоптозу при аутоімунних захворюваннях: Автореф. дис. ... к.б.н. – Харьков, 2005. – 20 с.
62. Родионов С.Ю., Лебединская О.В., Киселевский М.В. и др. К вопросу о механизмах противоопухолевой активности альфа-фетопротеина человека in vitro // Сиб. онколог. журнал. – 2006. – Т. 19, №3. – С. 41–47.
63. Стахеева М.Н., Эйдензон Д., Слонимская Е.М. и др. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы // Сиб. онколог. журнал. – 2011. – Т. 44, №2. – С. 11–19.
64. Сухих Г.Т., Богданова И.М., Малайцев В.В., Фисенко А.П. Иммунологические аспекты трансплантации фетальных клеток // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 126. – С.178–181.
65. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М. Перспективы использования фетальных стволовых/прогениторных клеток человека в клеточной терапии // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – №8. – С. 5–13.

66. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н. Влияние клеток цитотрофобласта плаценты человека на пролиферацию Т-лимфоцитов // Иммунология. – 2004. – №6. – С. 324–329.
67. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. – 2003. – Т. 68, Вып. 4. – С. 453–466.
68. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. – М.: Медицина, 1973. – 223 с.
69. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих // Проблемы криобиологии. – 2004. – №3. – С.58–71.
70. Храновська Н.М. Вплив трансплантації клітин алогенного кісткового мозку та клітин ембріональної печінки на протипухлинну резистентність організму: Автореф. дис. … к. б. н. – Київ, 2001. – 19 с.
71. Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Дроздова О.А., Останкова Л.В. Влияние низкотемпературного консервирования на пролиферативную активность и топографию расселения донорских и трупных колониеобразующих единиц (КОЕ) в облученном организме // Цитология и генетика. – 1980. – Т. 14, №6. – С. 25–30.
72. Цыб А.Ф. Морфофункциональное изучение терапевтической эффективности мезенхимальных и нейрональных стволовых клеток при диффузной травме головного мозга животных // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – №31. – С. 23–37.
73. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротеин. – Екатеринбург: Уро РАН, 2004. – С. 20–31.
74. Шевелев А.С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь. – М.: Медицина, 1976. – 237 с.
75. Ширшев С.В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биологии. – 1993. – Т. 113, №2. – С. 230–247.
76. Ямпольская Е.Е., Гольцев А.Н., Гурина Т.М. Изменение функционального потенциала клеток фетальной печени в зависимости от режима криоконсервирования // Світ медицини та біології. – 2007. – №1. – С. 89–93.
77. Ямпольская Е.Е., Дубрава Т.Г., Гурина Т.М., Гольцев А.Н. Изменение функционального состояния кроветворных клеток фетальной печени в зависимости от режима криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №4. – С. 426.
78. Ярилин А.А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология. – 2006. – №3. – С. 176–188.
79. Патент №4523, Україна, МПК A01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / В.І. Грищенко, А.М. Гольцев, Т.М. Гуріна, Н.М. Бабенко; заявник: ІПКіК НАН України; заявл. 24.05.2004; опубл.17.01.2005. Бюл.№1.
80. Патент №59206, Україна, МПК A01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / А.М. Гольцев, Є.О. Порожан, Н.М. Бабенко; М.В. Останков; заявник: ІПКіК НАН України; заявл. 4.10.2010; опубл.10.05.2011. Бюл. №9.
81. Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A. Gestation age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // Fetal Diagn. Ther. –1996. – №11. – P. 427–432.
82. Antin J.H., Ferrara J.L.M. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease // Blood. – 1992. – Vol. 80, №12. – P. 2964–2968.
83. Azari H., Louis S.A., Sharififar S., et al. Neural-colony forming cell assay: an assay to discriminate bona fide neural stem cells from neural progenitor cells // J. Vis. Exp. – 2011. – Vol. 49. – 2639.
84. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects / Ed. by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers. – Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. – 1380 p.
85. Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult mesenchymal stem sells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // J. Cell Mol. Med. – 2004. – Vol. 8, №3. – P. 301–316.

86. Barrandon Y. The biology of epidermal stem cells // Ann. Dermatol. Venereol. – 1998. – Vol. 125., №2. – P. 5–6.
87. Barry F. P., Murphy M.J. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2004. – №36. – P. 568–584.
88. Bazan E., Alonso F.J., Redondo C. et. al. In vitro and in vivo characterization of neural stem cells // Histol Histopathol. – 2004. – Vol.19, №4. – P.1261–1275.
89. Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis // J. Musculoskel. Neuron. Interact. – 2001. – Vol.1, №4. – P. 377–385.
90. Bettini M.L., Vignali D.A., Bettini M.L. Development of thymically derived natural regulatory T cells // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1183. – P. 1–12.
91. Bifari F., Pacelli L., Krampera M. Immunological properties of embryonic and adult stem cells // World J. Stem Cells. – 2010. – Vol. 2, №3. – P. 50–60.
92. Bubanovic V. Failure of blood-thymus barrier as a mechanism of tumor and trophoblast escape // Medical Hypotheses. – 2003. – Vol. 60, №3. – P.315–320.
93. Cardozo A.A., Ma-Lin Li., Batard P. Release from quiescence of $CD34^{+}CD38^{-}$ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 8707–8711.
94. Carr X., Blalock E. A molecular basis for intersystem communication between the immune and neuroendocrine system // Int. Rev. Immunol. – 1989. – Vol. 4, №3. – P. 213– 228.
95. Castriconi R., Daga A., Dondero A. et al. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties // J. Immunol. – 2009. – Vol.182, №6. – P. 3530–3539.
96. Catrina A. I., Ulfgren A. K., Lindblad S. et al. Low levels of apoptosis and high flip expression in early rheumatoid arthritis synovium // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – №61. – P. 934–936.
97. Ceponis A., Konttinen Y.T., Takagi M. Expression of stem cell factor (SCF) and SCF receptor (c-kit) in synovial membrane in arthritis: correlation with sinovial mast cell hyperplasia and inflammation // J. Rheumatol. – 1998. – Vol. 25. – P. 2304–2314.
98. Chang C.J., Yen M.L. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-γ // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24, №11. – P. 2466–2477.
99. Chen X., Fang L., Song S. et al. Thymic regulation of autoimmune disease by accelerated differentiation of $Foxp3^{+}$ regulatory T cells through IL-7 signaling pathway // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183, №10. – P. 6135–6144.
100. Chen X., Vodanovic-Jankovic S., Johnson B. et al. Absence of T-cell control of Th1 and Th17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease // Blood. – 2007. – Vol.110. – P. 3804–3813.
101. Costantino C.M., Baecher-Allan C., Hafler D.A. Multiple sclerosis and regulatory T cells // J. Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 28, №6. – P. 697–706.
102. Croiset G., Heijnen C., Wal W. et al. A role for the autonomic nervous system in modulating the immune response during mild emotional stimuli // Life Science. – 1990. – Vol. 46, №6. – P. 419–425.
103. Das G.D., Ross D.T. Neural transplantation: autoradiographic analysis of histogenesis in neocortical transplantats // Int. J. Dev. Neurosci.– 1986. – Vol. 4, №1. – P. 69–79.
104. David E., Guihard P., Brounais B. et al. Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma // Int. J. Cancer. – 2011. – Vol.128, №8. – P. 1822–1835.
105. Demetriou M., Binkert C., Sukhu B. et al. Fetuin/-2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-β type II receptor mimic and cytokine antagonist // J. Biochemistry. – 1996. – Vol. 271, №22. – P. 12755–12761.
106. Dudich E., Semenkova L., Dudich I. et al. Alpha-fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 266, №3. – P. 750–761.

107. Eggers K., Werneburg S., Schertzinger A. et al. Polycyclic acid controls NCAM signals at cell-cell contacts to regulate focal adhesion independent from FGF receptor activity // Cell Sci. – 2011. – Vol. 124, №19. – P. 3279–3291.
108. Eisele L.E., Mesfin F.B., Bennett J.A. et al. Studies on a growth-inhibitory peptide derived from alpha–fetoprotein and some analogs // J. Pept. Res. – 2001. – Vol. 57, №1. – P. 29–38.
109. Ema H., Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo // Blood. – 2000. – Vol. 95, N7. – P. 2284–2288.
110. Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000) // Neurochem. Res. – 2000. – Vol. 25, №9–10. – P. 1439–1451.
111. Ezoe S., Matsumura I., Nakata S., Gale K. GATA-2/estrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21 (WAF1) and p27 (Kip1) proteins // Blood. – 2002. – Vol. 100, №10. – P. 3512–3520.
112. Fang J., Zhang Z.X. Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat // Cryobiology. – 1992. – Vol. 29, №2. – P. 267– 273.
113. Fausto N., Campbell J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation // Mech. Dev. – 2003. – Vol.120. – P.117–130.
114. Ferrari D., Binda E., De Filippis L., Vescovi A.L. Isolation of neural stem cells from neural tissues using the neurosphere technique // Curr. Protoc. Stem Cell Biol. – 2010. – Chapter 2: Unit2D.6.
115. Field M., Alvarez A., Bushnev S., Sugaya K. Embryonic stem cell markers distinguishing cancer stem cells from normal human neuronal stem cell populations in malignant glioma patients // Clin Neurosurg. – 2010. – Vol.57. – P. 151–159.
116. Filippi M., Rovaris M., Rocca M. Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into «black holes» // Neurology. – 2001. – Vol. 57, №4. – P. 731–733.
117. Fischbach G.D. Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures // Develop. Biol. – 1972. – Vol. 28, №2. – P. 407–429.
118. Fletcher J.M., Lalor S.J., Sweeney C.M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis // Clin. Exp. Immunol. – 2010. – Vol. 162, №1. – P. 1–11.
119. Frans T.H., Humphrey H.H., Frederic J.H. Characterization of the human $CD34^+$ hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy // Hematologica. – 2005. – Vol. 90, №2. – P. 173–179.
120. Fransson M., Burman J., Lindqvist C. et al. T regulatory cells lacking CD25 are increased in MS during relapse // Autoimmunity. – 2010. – Vol. 43, №8. – P. 590–597.
121. Frohman E.M., Racke M.K., Raine C.S. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 354, №9. – P. 942–955.
122. Fujioka T., Yasuchia K., Nakamura Y. et al. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells // Int. J. Dev. Biol. – 2004. – Vol. 48, №10. – P. 1149–1154.
123. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // Science. – 2000. – Vol. 287, №5457. – P. 1433–1438.
124. Gibbs P., Chen Q., Robinson W.A. Effects of oncostatin M and tamoxifen on human melanoma cells // Melanoma Res. – 1998. – Vol. 8, №3. – P. 221–226.
125. Gilles J.M., Divon M.Y., Bentolia E. et al. Immunophenotypic characterization of human fetal liver hematopoietic stem cells during the midtrimester of gestation // Am. J. Obstet. – 1997. – №177, №3. – P. 619–625.
126. Gilyarov A.V. Nestin in central nervous system cells // Neurosci. Behav. Physiol. – 2008. – Vol. 38, №2. – P. 165–169.
127. Gluckman E. The therapeutic potential of fetal and neonatal hematopoietic stem cells // New Eng. J. Med. – 1996. – Vol. 335, №24. – P. 1839–1840.
128. Golks A., Brenner D., Fritsch C. et al. C-flip, a new regulator of death receptor-induced apoptosis // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, №15. – P. 14507–14513.

129. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G., Gurina T.M. Cryopreservation as selective method of enrichment with stem elements of embryonic neuronal cell population: Abstract Book of the Word Congress of Cryobiology and Cryomedicine. – Hamburg, Germany, 2006. – P.137.
130. Goltsev A.N., Babenko N.N., DubravaT.G. et al. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // Intern. Journal of Refrigeration. – 2006. – Vol. 29, №3. – P. 358–367.
131. Goltsev A.N., Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Ostankov M.V. Modifying effect of cryopreservation on anti-tumor activity of FLCs // Proceedings of Annual meeting of SLTB. – Hannover, 2009. – P. 39.
132. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // Biopreservation and Biobanking. – 2009. – Vol. 7, №1. – P. 29–38.
133. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation // CryoLetters. – 2011. – Vol. 32, №6. – P. 543–544.
134. Gossens K., Naus S., Corbel S.Y. et al. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P–controlled expression of thymic P-selectin/CCL25 // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 206, №4. – P.761–778.
135. Gudmundsson K.O., Thorsteinsson L., Sigurjonsson O.E. Gene expression analysis of hematopoietic progenitor cells identifies Dlg7 as a potential stem cell gene // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, №6. – P. 1498–1506.
136. Guichelaar T., Ten Brink C.B., Van Kooten P.J. Autoantigen-specific IL-10-transduced T cells suppress chronic arthritis by promoting the endogenous regulatory IL-10 response // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, №3. – P. 1373–1381.
137. Guo J., Qiang M., Luduena R.F. The distribution of β-tubulin isotypes in cultured neurons from embryonic, newborn, and adult mouse brains // Brain Res. – 2011. – Vol. 1420. – P. 8–18.
138. Halbleib J.M., Nelson W.J. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis // Genes Dev.– 2006. – Vol. 20, №23. – P. 3199–3214.
139. Hamazaki T., Iiboshi Y., Oka M., et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro // FEBS Lett. – 2001. – Vol. 497, №1. – P. 15–21.
140. Harris R.A., Hogarth P.M., Wadeson L.J. et al. An antigenic difference between cells forming early and late hemopoietic spleen colonie // Nature. – 1984. – Vol. 307, №5952. – P. 638–641.
141. Hess D.C., Borlongan C.V. Stem cells and neurological diseases // Cell Prolif. – 2008. – Vol. 41, №1. – P. 94–114.
142. Hessman C.J., Bubbers E.J., Billingsley K.G. et al. Loss of expression of the cancer stem cell correlates with advanced-stage colorectal cancer // Am. J. Surg. – 2012. – Vol. 203, №5. – P. 649–653.
143. Higgins A.Z., Cullen D.K., LaPlaca M.C., Karlsson J.O. Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // J. Neurosci. Methods. – 2011. – Vol. 30, №1. – P. 9–16.
144. Hirohata S. Role of bone marrow in pathogenesis rheumatoid arthritis // Challenges in Rheumatology / Ed. by M. Harjacek.– 2011.– [электронный документ: web-сайт] http://www.intechopen.com/books/challenges-in-rheumatology/role-of-bone-marrow-in-the-pathogenesis-ofrheumatoid-arthritis (20.04.2012).
145. Hulspas R., Quesenberry P.J. Characterisation of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry // Cytometry. – 2000. – Vol. 40, №3. – P. 245–250.
146. Huttner H. B., Janich P. The Stem cell marker prominin–1/CD133 on membrane particles in human cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease // Stem cells. – 2008. – Vol. 26, №3. – P. 698–705.
147. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C. et al. A stem cell molecular signature // Science. – 2002. – Vol. 298, №5593. – P. 601–604.

148. Jasperson L.K., Bucher C., Panoskaltsis–Mortari A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality // Blood. – 2008. – Vol. 111, №6. – P. 3257–3265.
149. Johal H., Scott G.M., Jones R. et al. Mouse mammary tumour virus-like virus (MMTV-LV) is present within the liver in a wide range of hepatic disorders and unrelated to nuclear p53 expression or hepatocarcinogenesis // J. Hepatol. – 2009. – Vol. 50, №3. – P. 548–554.
150. Jordan C.T., Lemischka I.R. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse // Genes Dev. – 1990. – №4. – P. 220–232.
151. Kettenmann H., Verkhratsky A. Neuroglia – living nerve glue // Fortschr. Neurol. Psychiatr. – 2011. – Vol. 79, №10. – P. 588–597.
152. Kim H.H., Van den Heuvel A.P., Schmidt J.W., Ross S.R. Novel common integration sites targeted by mouse mammary tumor virus insertion in mammary tumors have oncogenic activity // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, №11. – P. 1–13.
153. Kim S.Y., Kim K.M., Hoffman-Kim D. et al. Quantitative control of neuron adhesion at a neural interface using a conducting polymer composite with low electrical impedance // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 16–21.
154. Kinne R.W., Stuhlmueller B., Palombo-Kinne E. et al. The role of macrophages in the pathogenesis of rheumatoid arthritis // In: Rheumatoid arthritis: the new frontiers in pathogenesis and treatment / Ed. by F. Wollheim F., G.S. Firestein, G.S. Panayi. – Oxford: Oxford University Press, 2000. – P. 69–87.
155. Kishimoto H., Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells // J. Exp. Med. – 1997. – Vol. 185, №2. – P. 263–271.
156. Klassen H.J., Imfeld K.L., Kirov I.I. et al. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells // Cytokine. – 2003. – Vol. 22, №3–4. – P. 101–106.
157. Kuleshova L.L., Tan F.C., Magalhaes R. et al. Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification // Cell Transplant. – 2009. – Vol. 18, №2. – P. 135–144.
158. Kuroda T., Tanabe N., Sakatsume M. Interleukin-2 levels are elevated in the bone marrow serum of patients with Mutilans-type rheumatoid arthritis // Clin. Rheumatol. – 2002. – Vol. 21, №1. – P.23–27.
159. Kwidzinski E., Bunse J., Aktas O. et al. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation // The FASEB Journal. – 2005. – Vol. 19, N10. – P. 1347–1349.
160. Ladewig J., Koch P., Endl E. et al. Lineage selection of functional and cryopreservable human embryonic stem cell-derived neurons // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, №7. – P. 1705–1712.
161. Laoui D., Movahedi K., Van Overmeire E. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions // Int. J. Dev. Biol. – 2011. – Vol. 55, №7–9. – P. 861–867.
162. Laurson J., Selden C., Hodgson H.J. Hepatocyte progenitors in man and in rodents – multiple pathways, multiple candidates // Int. J. Exp. Pathol. – 2005. – Vol. 86, №1. – P. 1–18.
163. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study // Lancet. – 2008. – Vol. 371, №9624. – P. 1579–1586.
164. Li C.H., Kuo W.H., Chang W.C. et al. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer // Immunol. Res. – 2011. – Vol. 51, №1. – P. 71–79.
165. Lin C., Spikings E., Zhang T., Rawson D.M. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (Danio rerio) embryos and blastomeres // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, №1. – P. 42–47.
166. Lin W., Chen Y.L., Jiang L., Chen J.K. Reduced expression of chemerin is associated with a poor prognosis and a lowed infiltration of both dendritic cells and natural killer cells in human hepatocellular carcinoma // Clin. Lab. – 2011. – Vol. 57, №11–12. – P. 879–885.

167. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects // J. Transl. Med. – 2010. – Vol. 10, №8. – P. 131–146.
168. Liu Y.X., Ji L., Yue W. et al. Cells extract from fetal liver promotes the hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells // Cloning and Stem Cells. – 2009. – Vol. 11, №1. – P. 51–60.
169. Lossi L., Ghidella S., Marroni P., Merighi A. The neurochemical maturation of the rabbit cerebellum // J. Anat. –1995. – Vol.187, №3. – P. 709–722.
170. Louis S.A., Reynolds B.A. Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue // Methods Mol. Biol. – 2005. – Vol. 290. – P. 265–280.
171. Mandala S., Hajdu R., Bergstrom J. et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists // Science. – 2002. – Vol. 296, №5566. – P. 346–349.
172. Maniati E., Potter P., Rogers N.J., Morley B.J. Control of apoptosis in autoimmunity // J. Pathol. – 2008. – Vol. 214, №2. – P. 190–198.
173. Marotta L.L., Almendro V., Marusyk A. et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of $CD44^{+}CD24^{-}$ stem cell-like breast cancer cells in human tumors // Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121, №7. – P. 2723–2735.
174. Mellor A.L., Chandler P., Kook L.G. et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy // J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 57, №1–2. – P. 143–150.
175. Messam C.A., Hou J., Major E.O. Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody // Exp. Neurol. – 2000. – Vol. 161, №2. – P. 585–596.
176. Milosevic J., Storch A., Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23, №5. – P. 681–688.
177. Mohajeri M., Farazmand A., Mohyeddin B.M. et al. FOXP3 gene expression in multiple sclerosis patients pre– and post mesenchymal stem cell therapy // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2011. – Vol. 10, №3. – P. 155–161.
178. Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T. et al. Prevential of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism // Science. – 1998. – Vol. 281, №5380. – P. 1191–1193.
179. Nehlin JO, Barington T. Strategies for future histocompatible stem cell therapy // Biogerontology. – 2009. – Vol. 10, №4. – P. 339–376.
180. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A., Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells // Inflamm. Allergy Drug Targets. – 2009. – Vol. 8, №2. – P. 110–123.
181. Nierhoff D., Ogava A., Oertel M. et al. Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vitro repopulation capacity // Hepatology. – 2005. – Vol. 42, №1. – P. 130–139.
182. Norton W. T., Poduslo S. E. Neuronal perikarya and astroglia of rat brain: chemical composition during myelination // J. Lipid Res. – 1971. – Vol. 12, №1. – P. 84–90.
183. Ohnishi T., Nakamura O., Arakaki N., Daikuhara Y. Effect of phosphorylated rat fetuin on the growth of hepatocytes in primary culture in the presence of human hepatocyte-growth factor. Evidence that phosphorylated fetuin is a natural modulator of hepatocyte-growth factor // Eur. J. Biochem. – 1997. – Vol. 243, №3. – P. 753–761.
184. Orlic D., Anderson S., Biesecker L.G. et al. Pluripotent hemapoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 nF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92, №10. – P. 4601–4605.
185. Ouyang L., Shen L., Li T, Liu J. Inhibition effect of oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo // Biomedical Research. – 2006. – Vol. 27, №4. – P. 197–202.
186. Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C. et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect // Blood. – 2002. – Vol. 99, №5. – P. 1610–1619.

187. Park M.J., Min S.Y., Park K.S. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase–expessing dendritic cells are involved in the generation of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen-induced arthritis mouse model // Arthr. Res. Ther. – 2008. – Vol. 10, №1. – R11.
188. Paynter S.J. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells // Brain Res. Bull. – 2008. – Vol. 75, №1. – P. 1–14.
189. Pedersen K.O. Fetuin a new globulin isolated from serum // Nature (London). – 1944. – Vol. 154. – P. 575–586.
190. Piccirillo C.A., Shevach E.M. Naturally-occurring $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance// Semin. Immunol. – 2004.– Vol. 16, №2. – P. 81–88.
191. Petros T.J., Tyson J.A., Anderson S.A. Pluripotent stem cells for the study of CNS development // Front. Mol. Neurosci. – 2011. – Vol. 4.– 30.
192. Pithadia A., Jain S., Navale A. Pathogenesis and treatment of multiple sclerosis // Int. J. Neurology. – 2009. – Vol. 10, №2. – P. 34–42.
193. Richard M. P. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis // Nature Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 2, №7. – P. 1–9.
194. Robilotto A.T., Baust J.M, Van Buskirk R., Baust J.G. Involvement of the cysteine protease calpain family in cell death after cryopreservation // Cell Preservation Technology. – 2006. – Vol. 4, №1. – P. 17–30.
195. Sasaki T., Mizuochi C., Yuka Horio. et al. Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse // Development. – 2011. – Vol. 137, №23. – P. 3941–3952.
196. Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology // Endocr. Rev. – 2000. – Vol. 21, №4. – P. 412–443.
197. Seki T., Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM–H) in the developing and adult central nervous system // Neurosci Res. – 1993. – Vol. 17, №4. – P. 265–290.
198. Semenkova L.N., Dudich E.I., Dudich I.V. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by alpha-fetoprotein // Tumor Biol. – 1997. – Vol. 18, №5. – P. 261–273.
199. Serls A.E., Doherty S., Parvatiyar P. et al. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung // Development. – 2005. – Vol. 132. – P. 35–47.
200. Shcherbakov V.M., Tichonov V.M., Dudich A.V. et al. Use of doxorubicin-estrone and fetal alpha-fetoprotein for therapy of primary liver cancer // Proceedings of the 6th International Congress on Anti-Cancer Treatment.– 1996. – P. 223.
201. Shien K., Toyooka S., Ichimura K. et al. Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy // Lung Cancer. – 2012. – Vol. 77, №1. – P. 162–167.
202. Srabovici N., Mujagic Z., Mujanovic-Mustedanagic J. et al. Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumour tissue // Biochem. Med. – 2011. – Vol. 21, №2. – P. 131–138.
203. Sugita S., Futagami Y., Hori S., Mochizuki M. Transforming growth factor producing $FoxP3^+CD4^+CD25^+$ T cells by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions // Exp. Eye Res. – 2007. – Vol. 85, №5. – P. 626–636.
204. Sugiyama D., Kulkeaw K., Mizuochi C. et al. Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – Vol. 410, №2. – P.301–306.
205. Swallow C.J., Partridge E.A., Macmillan J.C. et al. 2HS-glycoprotein, an antagonist of transforming growth factor – in vivo, inhibits intestinal tumor progression // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64. – P. 6402–6409.
206. Takeichi M., Inuzuka H., Shimamura K. et al. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis // Neurosci Res. Suppl. – 1990. – Vol.13, №1. – P. 92–96.

207. Tan F. C., Lee K. , Gouk S. S. et al. Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols // CryoLetters. – 2007. – Vol. 28, №6. – P. 445–460.
208. Taylor M.A., Lee Y.H., Schiemann W.P. Role of TGF-beta and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis // Gene Expr. – 2011. – Vol. 15, №3. – P. 117–132.
209. Thoren L.A., Liuba K., Bryder D., Nygren J.M. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, №4. – P. 2045 –2053.
210. Thornton A.M., Shevach E.M. Suppressor effector function of $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164, №1. – P. 183–190.
211. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res. – 1961. – Vol. 14. – P. 213–222.
212. Tipping A.J., Pina C., Castor A. et al. High GATA-2 expression inhibits human haemopoietic stem and progenitor cell functional by effects on cell cycle // Blood. – 2009. – Vol. 113, №12. – P. 2661–2672.
213. Todaro M., D'Asaro M., Caccamo N. et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182, №11. – P. 7287–7296.
214. Tosh D., Strain A. Liver stem cells – prospects for clinical use // J. Hepatol. – 2005. – Vol. 42, №101. – P. 2973–2982.
215. Tsubaki T., Arita N., Kawakami T., Shiratsuchi T. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens // Arthr. Res. Ther. – 2005. – Vol. 7, №4. – P. 825–836.
216. Tzeng S.F. Neural progenitors isolated from newborn rat spinal cords differentiate into neurons and astroglia. // J Biomed. Sci. – 2002. – Vol. 9, №1. – P. 10–16.
217. Van Dijken P.J., Wimpersis J., Craford J.M., Ferrara J.L. Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice // Blood. – 1991. – Vol. 78, №10. – P. 2773–2779.
218. Velasco-Velazquez M.A., Homsi N., De La Fuente M., Pestell R.G. Breast cancer stem cells // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 44, №4. – P. 573–577.
219. Verfaille C. Adhesion receptors as regulators of hematopoietic process // Blood. – 1998. – Vol. 92, №8. – P. 2609–2612.
220. Vescovi A., Gtritti A., Cossu G., Galli R. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential // Cells Tissues Organs. – 2002. – Vol. 71, №1. – P. 64–76.
221. Wagh V., Meganathan K., Jagtap S. et al. Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing // Stem Cell Rev. Rep. – 2011. – Vol. 7, №3. – P. 506–517.
222. Walsmith J., Vannier E., Yarasheski K. Patients with rheumatoid arthritis have low protein synthesis rates and elevated TNF-alpha and transforming growth factor-beta transcript levels in skeletal muscle // Arthritis and Rheumatism. – 2003. – Vol. 48, №9. – P. 104.
223. Watanabe N., Wang Y.H., Lee H.K. et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in human thymus // Nature. – 2005. – Vol. 436, №7054. – P.1181–1185.
224. Webber D.J., Minger S.L. Therapeutic potential of stem cells in central nervous system regeneration // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2004. – Vol. 5, №7. – P. 714–719.
225. Weinreich M.A., Hogquist K.A. Thymic emigration: when and how T cells leave home // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, №4. – P. 2265–2270.
226. Weissman I.L. Stem cells: units of development, review units of regeneration, and units in evolution // Cell. – 2000. – Vol. 100, №7. – P. 157–168.
227. Wojcik-Stanaszek L., Gregor A., Zalewska T. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins // Acta Neurobiol. Exp. (Warsaw). – 2011. – Vol. 71, №1. – P. 103–112.

228. Wu A.G., Michejda M., Mazunder A. et al. Analysis and characterization of hematopoietic progenitor cells from fetal bone marrow, adult bone marrow, peripheral blood, and cord blood // Pediatr. Res. – 1999. – Vol. 46, №2. – P. 163–169.
229. Wu D.D., Nayar R., Keating A. Synergistic effect of stem cell factor with interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the proliferation of murine primitive hematopoietic progenitors // Exp. Hematol. – 1994. – Vol. 22, №6. – P. 495–500.
230. Xiang Y., Zheng Q., Jia B. et al. Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells // J. Zhejiang Univ. Sci. – 2007. – Vol. 8, №2. – P. 136–146.
231. Yu C.L., Tsai M.H. Embryonic apoptosis-inducing proteins exhibited anticancer activity in vitro and in vivo // Anticancer Res. – 2001. – Vol. 21, №3. – P. 1839–1856.
232. Zarling J.M., Shoyab M., Marquardt H. et al. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83, №24. – P. 9739–9743.
233. Zelenay S., Lopes-Carvallo T. Foxp3^{+}CD25^{-}CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, №11. – P. 4091–4096.
234. Zhao R., Watt A.J., Li J. et al. GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation // Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 25, №7. – P. 2622–2631.
235. Zlotoff D. A., Bhandoola A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2011. – Vol. 1217. – P. 122–138.

Применение низких температур при моделировании патологических состояний в эксперименте

Н.А. Чиж, Г.А. Ковалев, Б.П. Введенский, И.В. Слета, С.Е. Гальченко, Н.Ю. Шкодовская, Б.П. Сандомирский

Отдел экспериментальной криомедицины
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
электронная почта: chizh.kol@mail.ru

Моделирование заболеваний и патологических состояний широко используется в биологии и медицине. Биологические модели позволяют изучать в эксперименте патогенез, течение, исход и влияние лекарственных веществ на протекание моделируемого состояния или заболевания. Существует множество экспериментальных моделей [4]. В каждом конкретном эксперименте модель должна быть адекватна задачам, стоящим перед исследователями.

Авторами разработаны модели формирования патологических состояний у животных с использованием низких температур.

Моделирование некроза миокарда методом криодеструкции

Поиск новых вариантов моделирования некроза миокарда (НМ), позволяющих конкретизировать зону поражения был вызван высокой летальностью и отсутствием точной повторяемости повреждения сердца при использовании существующих моделей НМ, например таких, как ишемический некроз, вызванный перевязкой

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 613–622.
© Н.А. Чиж, Г.А. Ковалев, Б.П. Введенский и др., 2012

левой коронарной артерии. Применение низких температур для моделирования НМ позволило получать прогнозируемую зону НМ у крыс. Для этого криовоздействие на стенку левого желудочка производили азотным криоинструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности –195°С в течение 15 и 30 с [8]. Прототипом данной модели послужили эксперименты по формированию крионекроза миокарда у мышей [10].

Оперативные вмешательства проводили на спонтанном дыхании в условиях открытого пневмоторакса. Для более быстрой герметизации плевральной полости после проведения локальной криодеструкции сердца на смежные ребра накладывали провизорные швы. При этом сердце в операционную рану не выводили. Выбранный диаметр аппликатора исключал летальность животных (рис. 1).

Далее определяли зависимость функциональных и морфологических изменений сердца от локализации и экспозиции криовоздействия [5]. Для этого применяли разные оперативные доступы к сердцу. По результатам экспериментальных исследований (электрокардиографическим и морфологическим методами) установлено, что при оперативном доступе в IV–V межреберье в результате криовоздействия на сердце формировался передний, переднебоковой (рис. 2), а в V–VI межреберье – верхушечный НМ. На

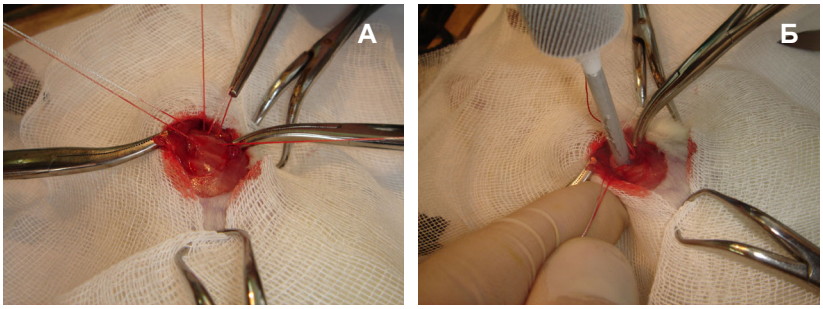


Рис. 1. Моделирование некроза миокарда: А – наложение провизорных швов перед криовоздействием на сердце; Б – проведение криовоздействия на сердце.

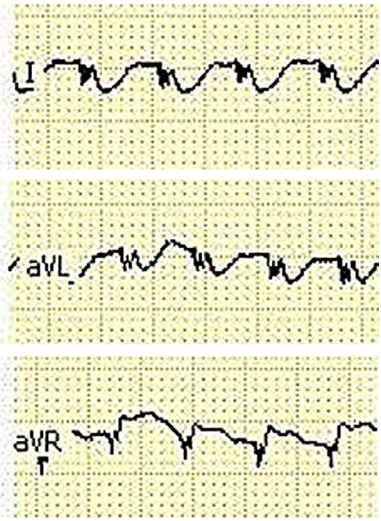


Рис. 2. ЭКГ крыс после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в IV–V межреберье через сутки после криовоздействия.

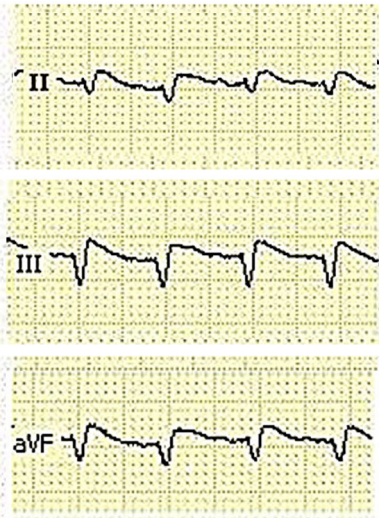


Рис. 3. ЭКГ крыс после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в V–VI межреберье через сутки после криовоздействия

ЭКГ зафиксированы изменения в отведениях I и avl в первом случае и отведениях II, III и avF – во втором (рис. 3).

В зависимости от длительности криовоздействия формировалась зона оледенения, соответствующая диаметру аппликатора, но с разной глубиной повреждения. Криоповреждение сердца в течение 15 с приводило к деструкции миокарда на глубину 0,28 ± 0,02 мм и снижению на ЭКГ амплитуды зубцов R, появлению q-зубца и отрицательных зубцов T, что свидетельствовало о развитии у животных субэпикардиального НМ. При увеличении времени криовоздействия на сердце до 30 с увеличивалась и глубина криоповреждения сердца до 0,42 ± 0,05 мм. При этом ЭКГ соответствовала картине трансмурального НМ. Появление зубца Q сопровождалось увеличением сегмента ST.

Показатели микроциркуляторного русла сердца крыс в периферической зоне на 14-е сутки после операций

Группы	Срок наблюдения	Диаметр капилляров, мкм	Относительная площадь сосудистого русла
Перевязка коронарной артерии	1 час	7,04 ± 0,32*	0,41 ± 0,11
	7-е сутки	6,29 ± 0,12*	0,44 ± 0,09
	14-е сутки	8,01 ± 0,42	0,48 ± 0,11
Криодеструкция 15 с	1 час	5,37 ± 0,28*	0,32 ± 0,10
	7-е сутки	6,34 ± 0,18*	0,36 ± 0,14
	14-е сутки	6,44 ± 0,15*	0,39 ± 0, 12
Норма		8,49 ± 0,29	0,49 ± 0,13

Примечание:* – результаты достоверны относительно нормы, $p < 0,05$.

Сравнивая микроциркуляторное русло сердца при ишемическом некрозе (перевязка левой коронарной артерии) и крионекрозе миокарда с помощью контактной биомикроскопии, выявили выраженные различия гемодинамики и микроструктуры в центральных и пограничных зонах повреждения миокарда на 14-е сутки. Показатели микроциркуляторного русла в периферических областях сердца (диаметр капилляров и относительная площадь сосудистого русла) после перевязки левой коронарной артерии восстанавливались быстрее по сравнению с криоповреждением сердца (таблица).

По данным гистологических исследований при некрозе миокарда, вызванного низкими температурами, формировалась зона реактивного воспаления без фазы ишемического повреждения. Организация соединительно-тканного рубца после локальной криодеструкции сердца происходила на 7 суток раньше, чем после перевязки коронарной артерии (рис. 4).

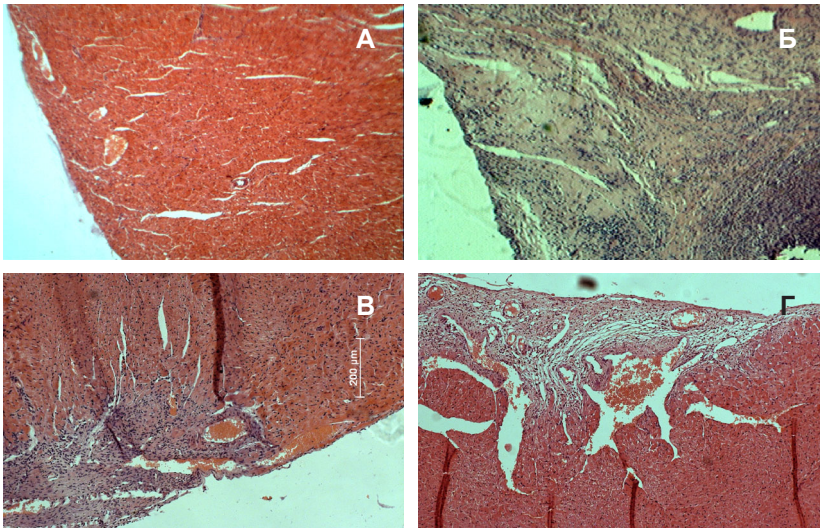


Рис. 4. Сердце крысы через 14 суток после операции: А – норма; Б – перевязка коронарной артерии; В, Г – криодеструкция 15 и 30 с соответственно. Окраска гематоксилином и эозином. Об. ×10, ок. ×10.

Преимуществом криохирургического способа моделирования НМ можно считать достаточно точное прогнозирование зоны и степени повреждения сердечной мышцы при заданных параметрах криовоздействия с формированием как субэпикардиального, так и трансмурального некроза миокарда, а недостатком – необходимость определенных практических навыков.

Локальная криодеструкция левого желудочка наряду с «классическим» способом формирования некроза миокарда (перевязка коронарной артерии) дает возможность воспроизвести субэпикардиальный и трансмуральный некроз сердечной мышцы, поэтому может использоваться в качестве модели для доклинических испытаний препаратов кардиотропного действия и исследований, направленных на изучение ремоделирования сердца с применением различных лечебных подходов, в том числе тканевой и клеточной терапии, при которых важна степень поражения миокарда.

Моделирование деструктивно-дистрофических процессов в коленном суставе методом криодеструкции

Повышенный интерес к экспериментальному моделированию деструктивно-дистрофических изменений в суставах обусловлен широкой распространенностью остеоартроза и значительным экономическим ущербом от этого заболевания. Среди всех заболеваний суставов остеоартроз является основной нозологией, его частоту можно сравнить с таковой при простудных и вирусных заболеваниях [11]. При изучении эффективности тех или иных методов лечения моделирование деструктивно-дистрофических процессов в суставах у лабораторных животных является общепринятой практикой [2]. Ввиду того, что существенное влияние на развитие указанных процессов оказывает механическая нагрузка, наиболее клинически значимым является моделирование деструктивно-дистрофических изменений крупных суставов, в частности коленного [3, 9].

Каждая из существующих экспериментальных моделей имеет свои особенности и недостатки – в первую очередь, травматичность, трудоемкость и риск развития осложнений. Для моделирования деструктивно-дистрофических процессов в суставах с помощью низких температур важную роль играют способы применения и характеристики используемого хладоагента.

В этой связи перспективным представляется интраартикулярная доставка хладоагента. При этом фронт образования льда возникает в полости сустава и распространяется из глубины к поверхности, процесс оттаивания элементов сустава проходит в обратной последовательности, что позволяет нивелировать потери хладопродуктивности и достигать максимально возможного для данного температурного диапазона повреждения элементов, образующих суставную полость.

Нами разработан способ моделирования деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе, в соответствии с которым воздействие на сустав осуществляется путем однократного введения в его полость 0,5 мл ацетона, охлажденного до –85...–95°С [7].

С этой целью ацетон в шприце с надетой иглой охлаждают в парах жидкого азота до полной кристаллизации. После чего шприц

выдерживают при комнатной температуре до появления признаков таяния льда и при появления достаточного количества жидкой фазы выполняют внутрисуставную инъекцию. Сустав пунктируют по медиальному краю связки надколенника под поверхностным ингаляционным наркозом. Операционное поле обрабатывают общепринятым методом.

Наблюдение за животными показало, что введение в полость сустава охлажденного до низких температур ацетона приводит к возникновению значительных повреждений элементов сустава.

После такой инъекции наблюдался болевой синдром, наиболее выраженный в первые 2–3-е суток, когда животные не включали соответствующую конечность в локомоторный акт, не позволяли касаться пораженного сустава, а попытка насильственного распрямления конечности вызывала вокализацию. При осмотре наблюдалась гиперемия области коленного сустава, пальпаторно определяли выпот в полости сустава.

Через неделю после вмешательства интенсивность болевого синдрома снижалась, животные позволяли проводить пальпацию в области сустава, однако в локомоторном акте движение конечности было ограничено. Имело место неполное разгибание в коленном суставе, которое не исчезало даже под наркозом, что свидетельствовало о развитии контрактуры органического генеза.

Макроскопическое исследование выявило массивные очаги кровоизлияния в капсуле сустава, которая выглядела утолщенной. Синовиальная оболочка была тусклой и утолщенной. Поверхность суставного хряща была без блеска.

По данным гистологического исследования через неделю после криоповреждения установлены морфологические изменения деструктивного генеза (рис. 5).

Повреждение хрящевой ткани суставов характеризовалось нарушением рельефа и узурацией поверхности хряща. Так, суставной хрящ имел разную толщину, отмечались тангенциальные трещины и щели различной конфигурации и размера.

Отмечалось нарушение целостности базофильного раздела. В области трещин нарушена цитоархитектоника хрящевой ткани, проявляющаяся в уменьшении количественного представитель-

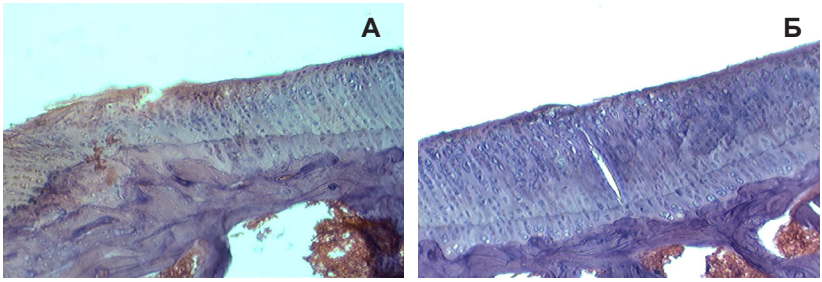


Рис. 5. Патоморфологические изменения суставного хряща в зоне повреждения на 7-е сутки. Трещины и разрывы суставного хряща. Очаги без клеток. Пикноз хондроцитов. Нарушение субхондральной кости. Окраска гематоксилином и эозином. А – об. ×10, ок. ×10; Б – об. ×20, ок. ×10.

ства хондроцитов и появлении их деструктивных форм. В некоторых местах наблюдались зоны, лишенные клеток.

В течение всего срока наблюдения за опытными животными никаких осложнений зафиксировано не было.

Моделирование холодовых повреждений кожи

Современная медицина широко использует биотехнические методы для лечения повреждений органов и тканей, особенно в комбустиологии при терапии поверхностных и глубоких ожогов. Ожоги и отморожения до сих пор являются травмами, не имеющими тенденции к снижению встречаемости.

С целью оценки терапевтического действия различных лекарственных препаратов, а также исследования влияния биологически активных веществ на репаративную регенерацию кожи было проведено моделирование экспериментальных холодовых повреждений кожи.

Для этого на кожу крысам в области наружной поверхности бедра после предварительного удаления шерстного покрова производили криовоздействие медным аппликатором диаметром 10 мм при температуре –196°С. Экспозиция составляла 60 с (рис. 6) [6].

В соответствии с принятой классификацией [1] по глубине поражения тканей раны представляли собой отморожения 2-й степени, что подтверждалось визуально и гистологически.

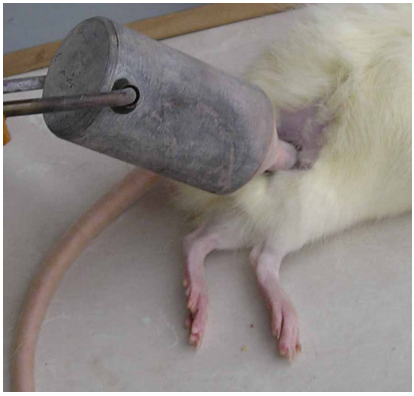


Рис. 6. Моделирование холодового повреждения кожи.

У животных в зоне отморожения на 3-и сутки происходила полная десквамация слоев эпидермиса, на 7-е сутки – эпителизация 1/3 поверхности повреждения. При исследовании зоны границы криоповреждения обнаруживали пролиферацию клеток на краю раны и молодой эпителий. В волосяных фолликулах наблюдалась пролиферация эпителия. Структура сосочкового и сетчатого слоев дермы не восстановлена. Продолжали нарастать признаки вторичного повреждения дермы вследствие нарушений микрогемодинамики, ишемии и гипоксии (рис. 7, А).

На 14-е сутки эксперимента наблюдали заживление 1/2 поверхности отморожения. Граница сосочкового и сетчатого слоев кожи к этому сроку не восстановливалась. Молодая грануляционная ткань содержала большое количество сосудов (рис. 7, Б).

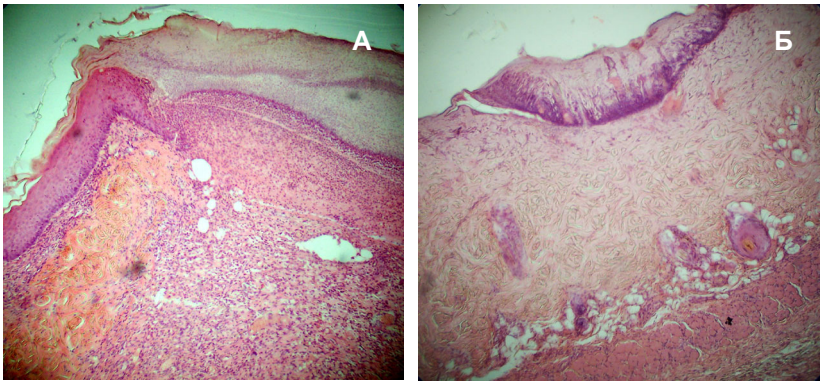


Рис. 7. Кожа крыс после криодеструкции: А – на 7-е сутки; Б – на 14-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Об. х10, ок. х10.

Достоинствами данного метода являются быстрое его выполнение и повторяемость эксперимента. Отличием холодового повреждения кожи является отсутствие грубых келоидных рубцов после заживления.

Таким образом, модели с использованием низких температур основаны на криодеструкции тканей с формированием прогнозируемой зоны деструктивно-дистрофических изменений. Их особенностью является быстрое и локальное формирование очагов крионекроза, поэтому они могут использоваться при изучении восстановления тканей и органов на фоне проводимой терапии. Однако ни одна модель не может с абсолютной полнотой воспроизвести изучаемый оригинал.

Литература

1. Арьев Т.Я. Термические поражения. – Л.: Медицина, 1966. – 703 с.
2. Ковалёв Г.А., Введенский Б.П., Сандомирский Б.П., Технология моделирования остеоартроза крупных суставов // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, №4. – С. 37–43.
3. Лила А.М. Остеоартроз коленных суставов: лечение с позиций доказательной медицины // Новые С.–Петербургские врачеб. ведомости. – 2006. – Т. 35, №1. – С. 38–44.
4. Моделирование заболеваний / Под ред. С.В. Андреева. – М.: Медицина, 1973. – 336 с.
5. Слета И.В., Чиж Н.А., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Моделирование некроза миокарда с помощью криотехнологии // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, №4. – С. 73–79.
6. Шкодовская Н.Ю., Гойденко Н.И., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Экспериментальные холодовые раны кожи при терапии экстрактами кожи новорожденных поросят // Проблеми медичної науки та освіти. – 2005. – №4. – С. 41–45.
7. Пат. 56629 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання деструктивно–дистрофічного процесу в колінному суглобі / Б.П. Введенський, С.Є. Гальченко, Г.О. Ковальов та ін.; замовник і патентовласник ІПКіК НАН України; заявл. 07.06.2010; опубл. 25.01.2011, Бюл. №2. – С. 5.98.
8. Пат. 53408 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання інфаркту міокарду / М.О. Чиж, І.В. Слета, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський; замовник і патентовласник ІПКіК НАН України; заявл. 12.03.2010, опубл. 11.10.2010, Бюл. №19. С. – 5.112.
9. Englund M. The role of biomechanics in the initiation and progression of OA of the knee // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. – 2010 – Vol. 24, №1. – P. 39–46.
10. Van den Bos E.J., Mees B.M.E., de Waard M.C. et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 289. – P. 1291–1300.
11. Valdes A.M., Spector T.D. The genetic epidemiology of osteoarthritis // Curr. Opin. Rheumatol. – 2010. – Vol. 22, №2. – P. 139–142.

Новый подход к созданию сосудистых протезов малого диаметра

Б.П. Сандомирский*, Д.В. Бызов,
И.П. Михайлова, Н.А. Чиж, О.П. Сынчикова

Отдел экспериментальной криомедицины
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: bsan38@yahoo.com*

В настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы и, в первую очередь, атеросклероз и его осложнения – главная причина смерти и инвалидизации населения в большинстве стран мира. Это заболевание может поражать артерии практически всех локализаций и часто приобретает генерализованный характер. Радикальным методом лечения ишемической болезни сердца является восстановление кровотока в суженной или закупоренной артерии путем операции артериального шунтирования с использованием сосудистых протезов. Сосудистые протезы также применяют в качестве сосудистых вставок при острых травмах, органных трансплантациях и формировании гемодиализных артериовенозных шунтов.

Результаты реконструктивных операций с использованием сосудистых протезов во многом зависят от вида и качества имплантатов. Несмотря на то, что в настоящее время созданы надежные сосудистые протезы для аорты и артерий крупного (> 10 мм) диаметра, по-прежнему остро стоит проблема протезирования артерий малого (< 6 мм) и среднего (< 8 мм) диаметра. Лучшими заменителями этих артерий считают аутогенные артерии и вены. Однако применение аутоартерий крайне ограничено, прежде всего, опас-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 623–654.
© Б.П. Сандомирский, Д.В. Бызов, И.П. Михайлова, и др. , 2012

Используемые сокращения
БМ – базальная мембрана
ВЭМ – внутренняя эластическая мембрана
ГМК – гладкомышечная клетка
КВ – коллагеновые волокна
ЭМ – эластическая мембрана

ностью ишемии донорской зоны, кроме того, в 30% случаев подходящие для трансплантации аутовены отсутствуют. Ограниченность применения аллогенных сосудистых протезов связана с осложнениями, развивающимися в послеоперационном периоде (иммунные реакции, хронические воспаления, кальциноз протеза, гиперпластические окклюзии), а также этическими вопросами использования кадаверного материала. Известно, что синтетические сосудистые протезы малого калибра в отдаленные сроки после имплантации в артерии тромбируются в 100% случаев [1–3].

Естественные биологические ткани значительно превосходят синтетические материалы, использованные для изготовления сосудистых протезов, и проявляют лучшие адгезивные свойства при последующей эндотелизации, способствуют росту эндотелия и в зависимости от метода обработки могут обладать механическими свойствами, подобными нативным сосудам [11, 28]. Многочисленные попытки внедрить в хирургическую практику ксеногенные биологические протезы продиктованы их очевидными преимуществами: сохранением архитектоники и конфузорности нативной артерии, нулевой хирургической порозностью, а также удобством для наложения анастомозов. Широкое внедрение ксенографтов в кардиохирургии актуально, поскольку они являются более доступными, дешевыми и снимают ряд этических проблем.

Проблема получения эффективных протезов артерий малого и среднего диаметра ксеногенного происхождения в большей степени, чем сосудистая аллопластика, связана с необходимостью преодоления иммунного конфликта. Для повышения биосовместимости трансплантатов клапанов сердца и сосудов предлагается разрушать в них клетки донора до имплантации, то есть проводить девитализацию ткани, таким образом уменьшая иммунную реакцию организма реципиента на трансплантат [26, 29]. На основе этого подхода девитализированные ксенососуды, лишенные кле-

точных компонентов (бесклеточные скаффолды), применяют в качестве сосудистых протезов, которые имплантируются больным. После трансплантации бесклеточный ксенокаркас постепенно замещается аутогенным внеклеточным матриксом, формируемым собственными клетками реципиента, и образует устойчивую долгосрочную структуру сосудистого биопротеза [17].

Сосудистый протез должен обладать биологической совместимостью, гипоиммуногенностью, механической прочностью, гемосовместимостью, отсутствием тромбогенности и токсичности и обеспечивать долгосрочную проходимость. Таким образом, для эффективного ксенопротезирования необходима предымплантационная обработка сосудов с целью снижения иммуногенности биоматериала, стабилизации структуры ткани, сохранения адекватных механических свойств, стерилизации биоматериала [4].

Большинство методов девитализации ксеноартерий основаны на продолжительной обработке ксеноткани различными детергентно-энзимными и консервирующими растворами (эпоксисоединения различного состава), а также гипо- и гипертоническими буферами, действие которых направлено на лизис с разрушением клеточных элементов (иммуногенных компонентов) сосудистой стенки, дублением ткани и ее структурной стабилизации. Методы химической обработки позволяют эффективно снижать антигенные свойства тканей и предупреждать бактериальное обсеменение биографтов за счет антисептических свойств используемых реагентов. Однако химические реагенты вызывают серьезные отрицательные эффекты (изменяются физико-механические свойства исходной донорской ткани, не исключается токсическое влияние биопротеза на организм реципиента), которые обуславливают склонность к кальцинозу и фиброзированию. Химическая обработка ухудшает качество ксенобиопротеза, в результате он приобретает «жесткость» и теряются его упругоэластичные свойства. Вместе с тем, повышается вероятность дополнительных процессов минерализации в ткани за счет увеличения количества центров нуклеации кальциноза, так как на степень кальцификации влияют химический состав и физические свойства биоткани. Под кальцификацией понимают образование кальцийсодержащих отложений на поверхности

или в объеме девитализированных ксенососудов с последующим формированием тромбоподобных структур и капсулы псевдоинтимы [30]. Среди осложнений преобладают тромбозы, наиболее частыми причинами которых являются «несостоятельность» путей «оттока», прогрессирование облитерирующего заболевания и наличие выраженных неоинтимальных стенозов зон анастомозирования. Как правило, это приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости реопераций [15]. Вышеуказанные эффекты в значительной степени ограничивают внедрение таких «химических» методик в практику.

За последнее десятилетие проблема создания адекватных сосудистых протезов не была решена, как и вопрос выбора адекватного сосудистого заменителя, особенно при протезировании сосудов малого диаметра. Ксенопротезирование артериальных сосудов может найти широкое применение в клинике после разработки новых методов модификации биотканей и новых способов адаптации генетической конституции трансплантата к тканям реципиента.

Данное исследование было нацелено на принципиально новый подход к созданию девитализированных сосудистых ксенопротезов малого диаметра с использованием физических факторов (замораживание-отогрев и ионизирующее облучение). В связи с этим были поставлены следующие задачи – изучение возможности использования низких температур и ионизирующего облучения при обработке ксеногенных сосудов малого и среднего диаметра с целью максимального повреждения клеточных компонентов сосудистой стенки при сохранении структурной целостности соединительнотканного каркаса; комплексная оценка прочностных характеристик и морфологической структуры обработанных ксенососудов; определение степени иммуногенности, функциональности и биосовместимости ксенотрансплантата, а также его устойчивости к тканевой дегенерации после сосудистого протезирования.

В работе использовали низкие температуры в качестве повреждающего фактора на клеточные компоненты сосудистой стенки и с целью долгосрочного хранения девитализированных

ксеноартерий. Установлено, что глубокое замораживание и последующий отогрев частично снижают иммуногенность биологических тканей, что связано со снижением экспрессии поверхностных клеточных антигенов [20, 27]. В литературе описаны результаты использования гамма-облучения для девитализации сердечных клапанов. Вызываемую облучением гибель клеток объясняют непосредственным радиационно-химическим повреждением ДНК и ци-тотоксическим влиянием образующихся свободных радикалов преимущественно на фосфолипиды мембран клеток. Под влиянием ионизирующего облучения инициируются молекулярные механизмы интерфазной гибели клеток [23, 24].

Таким образом, комбинированное использование указанных физических факторов может обеспечить снижение антигенных свойств ксеноартерий за счет повреждения основных мишеней иммуногенности – клеточных элементов, в данном случае эндотелия и гладкомышечных клеток. Замораживание с последующим облучением инициирует образование интра- и интермолекулярных поперечных связей (кросслинк-сшивки) за счет сшивающей активности фибриллярных белков, что приводит к более компактному расположению коллагеновых волокон в ксеногенных тканях и их структурной стабилизации [16, 21, 22, 31]. Криоконсервирование биоматериала обеспечивает структурную целостность соединительнотканных волокон, что в значительной мере определяет его биомеханические свойства [20]. Кроме того, ионизирующее облучение обеспечивает полноценную вирусную и бактериальную стерилизацию биоткани, а замораживание в жидком азоте – низкотемпературное хранение девитализированных ксеногенных артерий.

Сырьем для изготовления ксенобиопротезов служили внутригрудные артерии (*a. thoracica interna*) 6–8-месячных беспородных свиней. Артерии выделяли в течение 20 мин после забоя при соблюдении правил асептики и максимально возможной атравматичности. Артерии тщательно препарировали, удаляли жировые привески и излишки соединительной ткани со стороны адвентициальной оболочки. Внутренний диаметр выделенных артерий варьировал от 2,5 до 5 мм, длина – от 5 до 10 см. Сосуды трижды

промывали охлажденным до 4°С стерильным физиологическим раствором с добавлением антибиотиков и помещали в стерильные криостойкие контейнеры («Eurotubo», «Deltalab», Испания). Затем контейнеры помещали в жидкий азот, в котором они хранились при температуре –196°С, до следующего этапа обработки. Временной интервал от момента выделения артерий до замораживания не превышал 4 ч. Затем пробирки отогревали на водяной бане при 36°С и транспортировали в Национальный научный центр «Харьковский физико-технический институт» НАН Украины, в котором с помощью линейного ускорителя электронов ЛУЭ-2000 их облучали потоком электронов. В работе применяли два экспериментальных режима облучения с разной величиной поглощенной дозы: режим I – 25 кГр и режим II – 50 кГр. Доза 25 кГр выбрана как минимально необходимая для обеспечения стерильности медицинских материалов, доза 50 кГр – как максимально допустимая для сохранения фибриллярных белков сосудистого матрикса. С целью предупреждения тепловой денатурации соединительной ткани в процессе облучения постоянно контролировали температуру образцов (не более 25°С), облучение осуществляли дискретно, распределив дозу во времени. Стерильные контейнеры с образцами после облучения хранили в парах жидкого азота при температуре от –150 до –170°С.

Для оценки морфологической структуры сосудов использовали оптическую микроскопию с окрашиванием препаратов разными способами: импрегнация серебром межэндотелиальных границ по T. Zand в модификации И.К. Кондакова [13], окраска гематоксилином и эозином (для клеточных структур), пикрофуксином по Ван-Гизон (для коллагеновых волокон). Анализ материала проводили под микроскопом («Meiji Techno», Япония) с выводом изображения в цифровом виде на персональный компьютер.

Для проведения электронно-микроскопических исследований образцы фиксировали по стандартной методике [14]. Ультраструктуру сосудистой стенки изучали при ускоряющем напряжении 75 кВ с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К, снабженного системой съемки и анализа изображения САИ-01А («Selmi», г. Сумы), с использованием CCD-камеры DX-2 и пакета программ «Карра» (Германия).

Прочность в продольном направлении (strength-test), упругость и максимальное растяжение артерий измеряли на универсальном деформирующем устройстве FP 100/1 («TIW Rauenstein», Германия). Прочность артерий в радиальном направлении (burst-test) исследовали на оригинальном устройстве, состоящем из ресивера с электронным датчиком давления MPX-5700DP («Freescale Semiconductor», Китай).

Статистические данные оценивали по универсальному критерию Манна-Уитни с помощью программы SPSS 17. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Количественные данные представлены в виде средних величин и стандартных девиаций. Построение и обработку диаграмм и графиков выполняли с помощью программ «Origin Pro8».

Морфологическая структура девитализированных артерий

Внутренняя оболочка артерии включает эндотелий, подэндотелиальный слой и внутреннюю эластическую мембрану. Эндотелий выстилает просвет артерии и состоит из вытянутых по оси сосуда плоских клеток с овальным ядром (эндотелиоцитов) и выполняет важные функции, обеспечивающие гомеостаз: регулирование тонуса кровеносных сосудов, миграция лейкоцитов, свёртывание крови, проницаемость кровеносных сосудов, представление антигенов, врождённый иммунитет, ангиогенез и другие функции. Средняя оболочка состоит в основном из гладких мышечных клеток (ГМК), которые располагаются по спирали и являются мультипотентными, т. е. способными к пролиферации и дифференцировке в другие клеточные элементы стенки, а также синтезируют гликозаминогликаны, коллаген, эластин, формируют матрикс медии сосуда и принимают участие во внеклеточном и внутриклеточном накоплении липидов.

Структуру внутреннего слоя сосудов и степень его повреждения выявляли методом импрегнации серебром клеточных границ эндотелиоцитов, которые наиболее чувствительны к изменению среды. Для эндотелиального слоя нативных артерий свиньи характерны непрерывная выстилка, полигональная форма клеток, однотипность и однородность их морфологического строения (рис. 1, а).

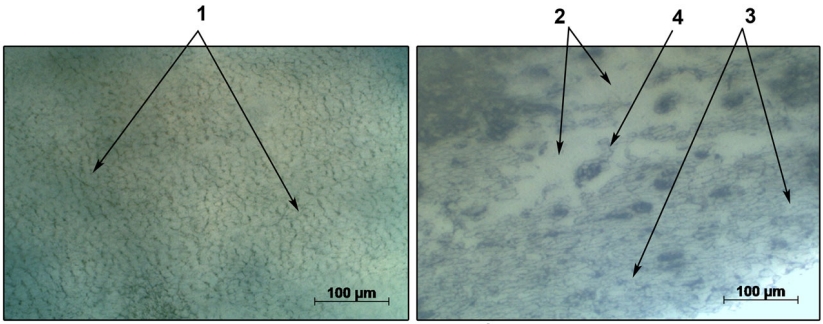


Рис. 1. Эндотелиальный слой артерий свиньи: а – нативная артерия (1 – непрерывная эндотелиальная выстилка); б – артерия после замораживания до –196°С и отогрева (1 – деэндотелизированные поля; 2 – сохраненный эндотелий; 3 – отдельные группы эндотелиоцитов). Импрегнация межклеточных границ серебром, ×200.

На гистологических препаратах интима нативных внутригрудных артерий свиньи представлена хорошо выраженным, тонким непрерывным эндотелиальным слоем. Эндотелиоциты имеют уплощенную форму и округлые ядра. Внутренняя эластическая мембрана (ВЭМ) отграничивает сосудистую интиму от среднего слоя, обеспечивает транспорт макромолекул из крови в толщу сосудистой стенки, участвует в обеспечении тромборезистентности и проявляет устойчивость к лейкоцитарной адгезии. Для средней оболочки артерий характерны циркулярно расположенные мышечные волокна с округлыми ядрами ГМК, находящиеся между эластическими мембранами (ЭМ). ЭМ имели выраженную извитость, гладкие и четкие контуры. Между мембранами определялись хорошо выраженные коллагеновые волокна (КВ). Адвентициальный слой состоял из рыхлых соединительнотканных волокон (рис. 2, а).

Первый этап девитализации ксеногенных артерий заключался в низкотемпературной обработке нативного ксеноматериала. После замораживания артерий до температуры жидкого азота и отогрева были выявлены деэндотелизированные поля и участки сохранившейся эндотелиальной выстилки, а также единичные груп-

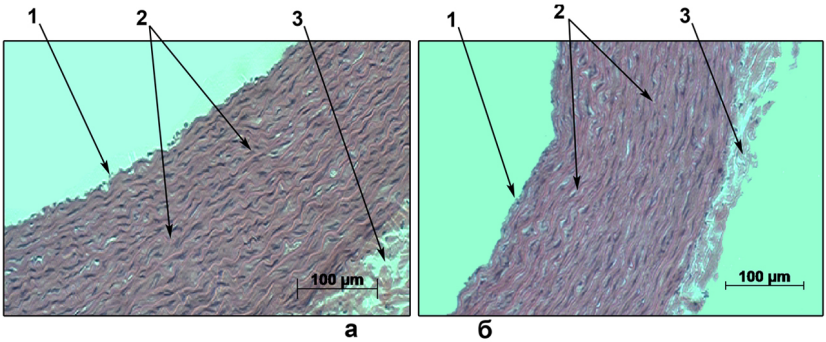


Рис. 2. Морфологическая структура сосудистой стенки: а – нативная артерия (1 – интима (эндотелиальный слой и ВЭМ); 2 – сосудистая медиа; 3 – адвентиция); б – артерия после замораживания-отогрева (1 – интима (десквамированный эндотелий и ВЭМ); 2 – сосудистая медия; 3 – адвентиция). Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

пы эндотелиоцитов. В сохранившихся эндотелиальных клетках обнаруживались микродефекты и разрывы межклеточных контактов, наблюдались гетерогенность по площади, а также полиморфизм. Эти изменения свидетельствовали о высокой степени повреждения сохранившихся клеток (рис. 1, б) [10]. Морфоструктура интимы артерий после замораживания-отогрева представлена в основном десквамированными эндотелиальным и подэндотелиальным слоями. Сохранившиеся эндотелиоциты были неправильной формы и уменьшены в размерах. Целостность ВЭМ сохранена, отмечались участки ее разрыхления, при этом непрерывность ее структуры не нарушена. В среднем слое артериальной стенки наблюдались разволокнение и набухание КВ с множественными продольно-ориентированными микроразрывами мышечных волокон вследствие механического напряжения, которое претерпевала стенка сосуда при кристаллообразовании. Размеры ГМК не изменены, однако их ядра деформированы. Эластические волокна (ЭВ) артерий после замораживания-отогрева характеризовались снижением извитости и компактным расположением. Их целостность, непрерывность и пространственная ориентация не нарушены. Структура КВ преимущественно сохранялась. Соединительно-

тканные волокна адвентициального слоя не изменялись по сравнению с нативом, имели рыхлую структуру (рис. 2, б).

Таким образом, замораживание-отогрев артерий свиньи приводит к формированию множественных очагов деэндотелизации, повреждению ГМК стенки сосуда, разволокнению и микроразрывам мышечных волокон. Изменения соединительнотканной структуры сосудистой медии заключаются в уплотнении и более компактном расположении волокон, структурная целостность которых практически не нарушена [5].

Второй этап девитализации ксеноткани заключался в облучении потоками электронов артерий свиньи после замораживания-отогрева. Импрегнация серебром люминальной поверхности девитализированных артерий продемонстрировала полное отсутствие эндотелиальной выстилки при облучении в режимах I и II (рис. 3). Проведенные гистологические исследования показали, что, в отличие от нативных артерий, в сосудистой стенке артерии после замораживания-отогрева и облучения в дозе 25 кГр были выявлены обширные участки десквамации эндотелия. Определялись деформированные и сегментированные ядра ГМК, расположенные между сближенными эластическими мембранами. Средняя оболочка сосудистой стенки состояла из разволокненных мышечных волокон, на которых отмечались микроразрывы (рис. 4, а). После облучения в дозе 50 кГр эндотелиоциты отсутствовали по всей

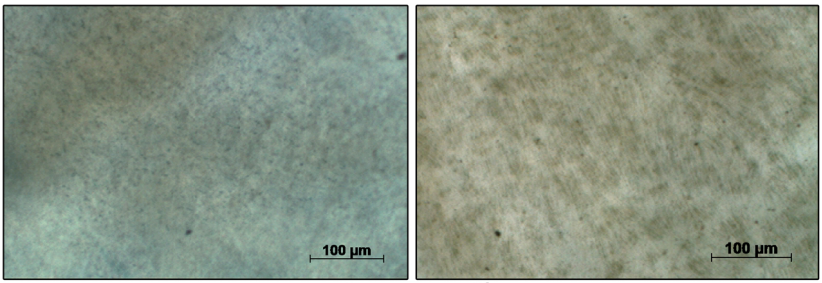


Рис. 3. Артерии после замораживания-отогрева и последующего облучения потоком электронов в дозе 25 (а) и 50 кГр (б). Импрегнация серебром межклеточных границ, ×200.

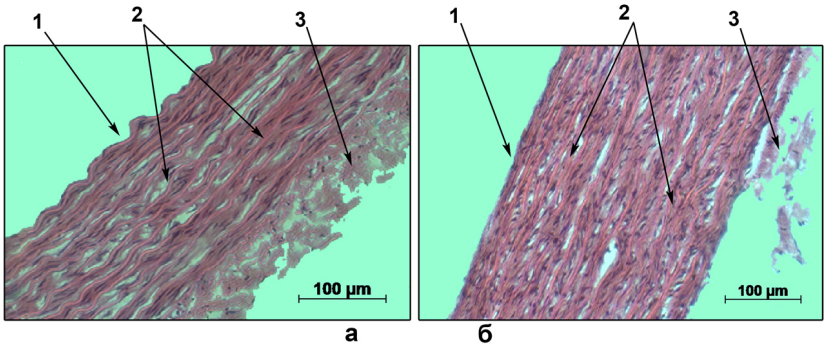


Рис. 4. Морфологическая структура сосудистой стенки после замораживания-отогрева и последующего облучения потоками электронов: а – доза 25 кГр (1 – интима (эндотелий отсутствует); 2 – сосудистая медия; 3 – адвентиций); б – доза 50 кГр (1 – интима (эндотелий отсутствует); 2 – сосудистая медия; 3 – адвентиция). Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

длине артерии, отмечены сегментированные и деформированные ядра ГМК (рис. 4, б). Интима девитализированных артерий была представлена хорошо сохраненной ВЭМ с гладкими и четкими контурами, нарушения непрерывности не выявлены. Структура соединительнотканных волокон преимущественно сохранена, при этом участки их разволокнения отсутствовали. Структурная целостность и пространственная ориентация соединительнотканных волокон сохранялись во всех исследуемых образцах. В группах с разной дозой облучения архитектоника сосудистой стенки сохранена. Отмечены уплотнение и утолщение волокон, а также снижение их извитости. Мы предполагаем, что в соединительной ткани формируются поперечные сшивки между отдельными волокнами коллагена (появление дополнительных сшивок связей С–С), что визуально проявляется в виде их компактного расположения (рис. 4). Адвентициальный слой представлен разрыхленными КВ и существенно не изменен.

Таким образом, после комбинированного действия двух физических факторов клеточные элементы сосудистой стенки полностью разрушены, ВЭМ, КВ и ЭМ сохранили целостность и непрерывность, базальная мембрана оставалась интактной.

Ультраструктура сосудистой стенки девитализированных ксеноартерий

Результаты сравнительного анализа ультраструктуры сосудистой стенки артерии свиньи после низкотемпературного воздействия и последующего отогрева, облучения по одному из двух режимов, различающихся величиной поглощенной дозы, и сочетанного действия двух физических факторов детально описаны нами ранее [8].

Ультраструктурный анализ состояния стенки артерии после замораживания в жидком азоте, отогрева и облучения потоком электронов с дозами 25 и 50 кГр свидетельствовал о глубоких деструктивных изменениях клеточных компонентов. Существенной разницы в группах, облученных по режимам I и II, не обнаружено. В обоих случаях весь эндотелиальный слой был подвержен десквамации. В большей части отслоившихся эндотелиальных клеток выявлены признаки деструкции. Подэндотелиальный слой представлен рыхлой соединительной тканью, содержащей разволокненные КВ. Наблюдались очаговый лизис плазмолеммы и фрагментация базальных мембран ГМК. В медии артерии обнаруживалось значительное количество сильно разрушенных ГМК и больших электронно-светлых полостей, содержащих клеточный детрит (рис. 5, а). В местах максимального разрушения клеток наблюдались единичные очаги лизиса коллагеновых волокон (рис. 5, б). В структуре медии ЭМ и КВ преимущественно сохраняли свою целостность. Однако при обеих дозах облучения наблюдались некоторое разрыхление коллагеновых пучков и очаговый лизис коллагеновых волокон. Зоны прикрепления КВ к ЭМ практически не повреждены (рис. 6). Установлено, что каркасные структуры (эластические мембраны и связанные с ними пучки коллагеновых волокон) более устойчивы к используемым воздействиям и менее подвержены структурной деградации.

Полученные электронно-микроскопические данные хорошо соотносятся с результатами, касающимися увеличения прочности артерий в продольном и радиальном направлениях. Прочностные свойства в значительной степени связаны с частичным или полным разрушением ГМК, которые формируют матрикс медии сосуда,

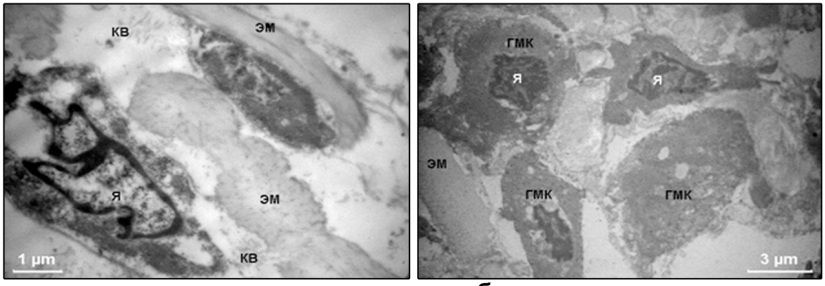


Рис. 5. Структура медии артерии после облучения дозами 25 (а) и 50 кГр (б). ГМК с признаками деструктивных изменений ядра и цитоплазмы (а, б), электронно-светлые участки – очаги лизиса КВ.

а также обеспечивают его пространственное распределение и удержание каркаса. Разрушение клеток мышечного слоя приводит к образованию внутренних полостей в межмембранных пространствах, что возможно обеспечивает сближение ЭМ и усиливает структурную жесткость сосудистой стенки. Кроме того, значительное влияние на пластические свойства артерий оказывает разрыхление коллагеновых пучков (в результате изменения межбелковых взаимодействий) за счет формирования поперечных сшивок молекул коллагена. Во всех случаях экспериментального воздействия наиболее слабым звеном структуры артерии были клеточные элементы и непосредственно контактирующие с ними зоны КВ. Установлено, что каркасные структуры более устойчивы к используемым воздействиям и менее подвержены структурной деградации.

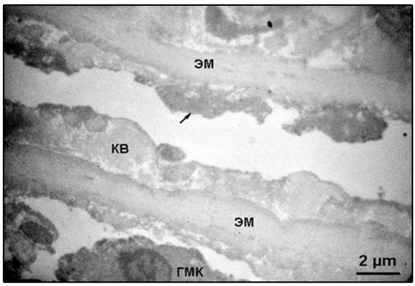


Рис. 6. Фрагменты разрушенных ГМК (стрелка), расположенных между двумя сохраненными ЭМ, в медии ксеноартерии после замораживания и облучения дозой 50 кГр.

Таким образом, морфологические исследования продемонстрировали, что глубокое замораживание, последующий отогрев и ионизирующее облучение (в исследуемых дозах) приводят к девитализации фрагментов артерий свиньи с сохранением эластических мембран и пучков коллагеновых волокон, а также их пространственных взаимосвязей. Сохранность структурных матричных белков обеспечивает каркасные функции девитализированного ксенососуда, что позволяет самостоятельно применять их в качестве бесклеточных сосудистых протезов [6, 18].

Биомеханические свойства артериальной стенки

Функционирование ксенобиопротеза, постоянно подвергающегося хронической нагрузке в виде давления тока крови, непосредственно связано со структурной целостностью сосудистой стенки, зависит от взаимного расположения коллагеновых и эластиновых волокон и их молекулярной конформации. Физиологические аспекты функционирования ксенобиопротеза, включая процессы гемоциркуляции и клеточной адгезии, фагоцитоза, определяются его физико-механическими свойствам и являются важными общепринятыми характеристиками биоматериала [7, 9, 25].

Показатели стресс-деформации определяли путем последовательного ступенчатого растяжения сегментов артерий длиной 3 см с регистрацией прилагаемой нагрузки (F) и соответствующей ей деформации (L), возникающих непосредственно после каждого шага растяжения. Деформирование артерий (со скоростью 60 мм/мин) продолжали до момента нарушения целостности сосудистой стенки, при этом регистрировали приложенную предельную нагрузку и показатель максимального удлинения артерии. Как видно, замораживание-отогрев достоверно повышает прочность и предельную деформацию артерий в продольном направлении (рис.7). Облучение потоком электронов также приводит к повышению прочностных характеристик артерий и увеличивает показатель относительного удлинения. Максимальное растяжение артерий после замораживания-отогрева и последующего облучения также достоверно больше по сравнению с нативными сосудами и не зависит от дозы облучения. Предельное напряжение разрыва и пиковая

деформация зависят в основном от целостности цепи и взаимного расположения фибриллярных белков. В связи с этим считается, что механизм описанных наблюдений обусловлен формированием дополнительных внутри- и межмолекулярных кросслинк-сшивок между отдельными коллагеновыми фибриллами, вызванных радиационным облучением [16, 22]. В меньшей степени некоторое количество подобных сшивок образуется и во время процесса замораживания-отогрева [21, 31].

Для определения прочности в радиальном направлении сегменты артерий длиной около 4 см одним концом фиксировали на рабочей части прибора, другой – перевязывали капроновой лигатурой с целью формирования замкнутой полости. В просвет артерии постепенно нагнетали воздух под возрастающим давлением до нарушения целостности сосудистой стенки. Следует отметить, что определение предельной прочности артерий с помощью биаксиального теста является более показательным и точным, т. к. от-

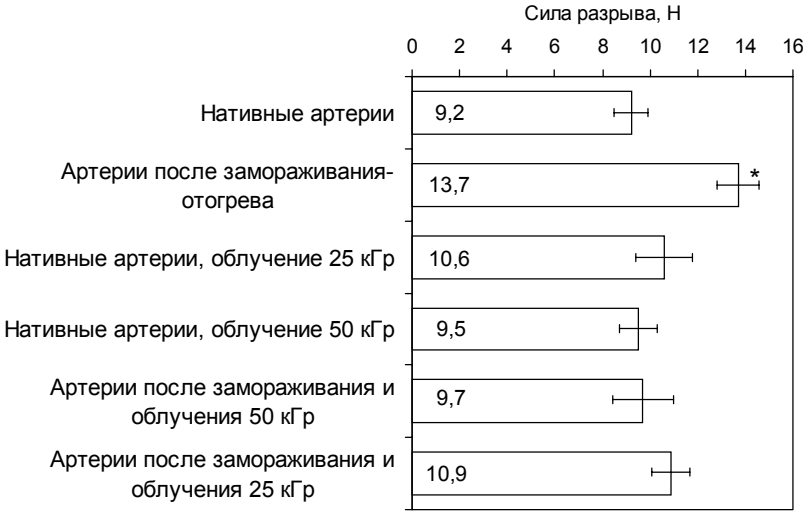


Рис. 7. Механическая прочность ксеноартерий в продольном направлении (strength-test), $n = 50$, $p < 0{,}05$.

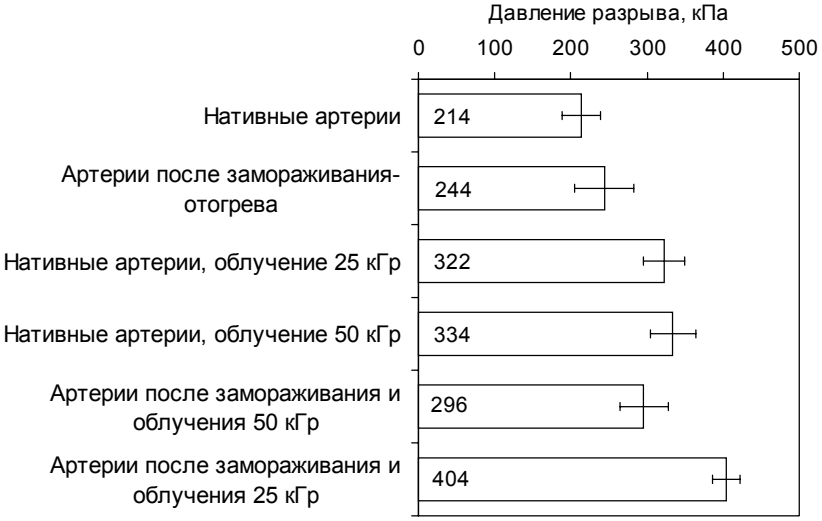


Рис. 8. Механическая прочность ксеноартерий в радиальном направлении (burst-test), $n = 50$, $p < 0{,}05$.

ражает равномерное распределением нагрузки на все соединительнотканные компоненты сосудистой стенки.

Проведенное нами исследование burst-test продемонстрировало статистически значимое увеличение прочности замороженных и облученных артерий по сравнению с нативными сосудами (рис. 8).

Важной характеристикой биоматериала, содержащего соединительную ткань, является его пластичность. Следует отметить, что показатели стресс-деформации характеризуют упругость и пластичность материала и являются важными биомеханическими параметрами соединительнотканных структур. С целью снижения возможных погрешностей измерений, вызванных неоднородностью сосудистой стенки на различных участках одной артерии, и на основании абсолютных значений нагрузки, приложенной в определенную единицу времени, был вычислен соответствующий показатель напряжения (мПа) по формуле:

$$\sigma = \frac{F}{S},$$

где F – приложенная сила деформации, Н; S – площадь поперечного сечения артерии, м^2.

Для определения величины S поперечный срез каждого артериального сегмента, взятый перед проведением испытания, измеряли с точностью до 10 мкм на микроскопе «Meiji Techno» (Япония) в 10 точках по периметру и рассчитывали среднее значение.

Соответствующее каждому показателю напряжения значение относительной деформации (%) сосудистой стенки определяли по формуле:

$$\varepsilon = \left(\frac{L_1 - L}{L} \right) \cdot 100\%,$$

где L_1 – длина деформированного артериального сегмента при определенном напряжении, мм; L – первоначальная длина артериального сегмента, мм.

Усредненные для всех измеренных образцов кривые зависимостей напряжения-деформации нативных артерий и артерий после обработки приведены на рис. 9 [8, 11]. Все кривые имеют характерную для соединительнотканных структур S-образную форму с четко определяемыми участками, соответствующими вязкому течению, упругой деформации и напряжению разрушения ткани. Графики упругой деформации, характеризующие жесткость сосудистой стенки и отображающие модуль Юнга, сопоставимы во всех исследуемых группах артерий. Начальные отрезки кривых отражают «скольжение» отдельных фибрилл в волокне относительно друг друга и соответствуют процессу, близкому к вязкому течению. Следует отметить, что участки кривых деформации обработанных сосудов соответствуют области физиологических нагрузок на артерии, и находятся в пределах границ вариабельности натив-

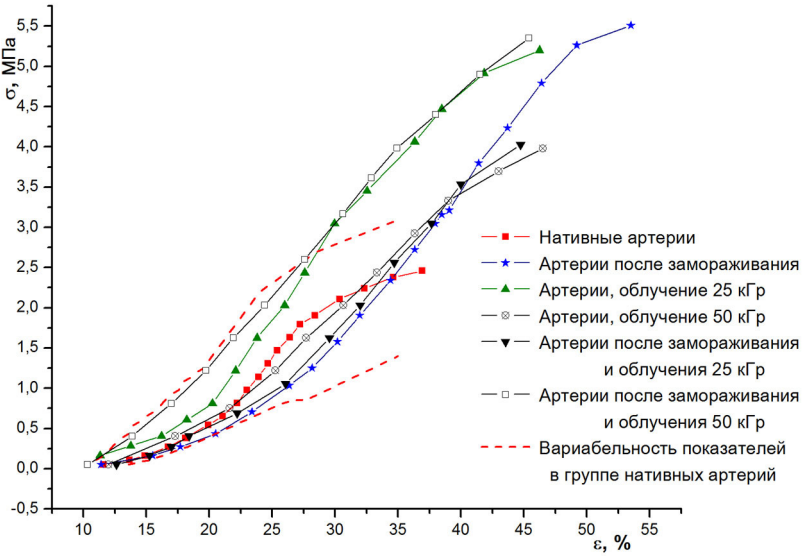


Рис. 9. Графики зависимости относительной деформации сосудистой стенки от приложенной нагрузки; ✧ – достоверно относительно группы контроля, $p < 0,05$.

ных сосудов. Основные отличия кривых упругой деформации в исследуемых группах артерий связаны с различной длиной участков, которые являются показателями растяжимости и предельной прочности артерий. Эти значения отражают удлинение соединительнотканных волокон, за счет растяжения фибрилл коллагена и эластина и их величина для всех групп обработанных артерий в значительной степени превышает данный показатель для нативных артерий. Другими словами, приложенная нагрузка, вызывающая начальное разрушение отдельных соединительнотканных фибрилл в группе нативных артерий, приводит лишь к дополнительному их удлинению после воздействия изучаемых физических факторов. Следует также отметить, что области упругой деформации артерий после комбинированного действия замораживания-отогрева и последующего облучения расположе-

ны слева от кривой деформации нативных артерий и характеризуются меньшей деформацией при идентичной нагрузке, что свидетельствует о тенденции к некоторому повышению упругости в этих группах.

Таким образом, прочность артерий после изучаемых физических воздействий не снижается. Вклад замораживания-отогрева приводит к повышению прочности в продольном направлении и не влияет на прочность в радиальном направлении. Ионизирующее облучение вызывает повышение прочности во взаимно перпендикулярных направлениях. При этом упругость обработанных артерий в области физиологических нагрузок остается на уровне нативных сосудов.

Биосовместимость и степень иммуногенности артерий после замораживания-отогрева и ионизирующего облучения при ксеноимплантации

Для изучения биосовместимости и степени иммуногенности артерий на этапах девитализации выполняли их ксеноимплантацию [6,18]. Сегменты артерий длиной около 1 см рассекали и прямоугольный сосудистый лоскут подсаживали под кожу крысам. Исследование проводили на 2-месячных самках (n = 80) линии Вистар, возрастом 3 месяца и массой тела 100–150 г. В эксперименте изучали следующие группы артерий: 1 – замороженные-отогретые; 2 – замороженные-отогретые, облученные дозой 25 кГр; 3 – замороженные-отогретые, облученные дозой 50 кГр; 4 – нативные артерии свиньи (контроль). На 3, 7, 14-е сутки, через 4 и 8 недель после операции животных выводили из эксперимента, извлекали имплантированный участок артерии вместе с окружающими тканями. Изучали макроскопическую реакцию тканей на имплант. Выраженность клеточной инфильтрации извлеченных образцов и целостность соединительнотканной структуры имплантатов оценивали гистологически.

Результаты исследований показали, что на 7-е сутки в области имплантации нативных артерий отмечены гиперемия подлежащих тканей и выраженное разрастание соединительной ткани вокруг

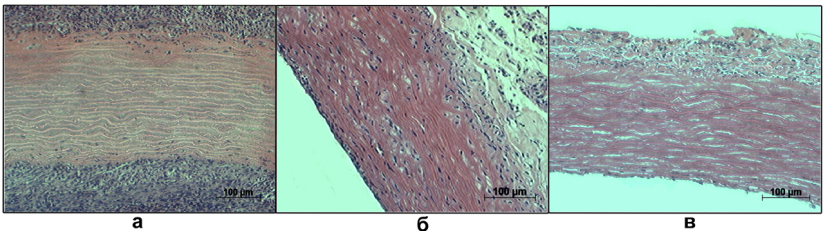


Рис. 10. Имплантация артерий под кожу животным через 7 суток : а – нативные артерии; б – после замораживания-отогрева; в – после замораживания и облучения. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

имплантата. После подсадки нативные артерии характеризуются формированием массивного лейкоцитарного вала вокруг имплантата, отделяющего сосудистую стенку от окружающих тканей, что свидетельствует о развитии острой воспалительной реакции (рис. 10, а). В группе артерий, подвергнутых замораживанию-отогреву, отмечены четко выраженная лейкоцитарная адгезия преимущественно по внутренней поверхности сосудистой стенки и очаги инфильтрации в сосудистой медии. Причем, если в сосудистой медии преобладали макрофаги, то по краю сосудистой стенки располагались преимущественно лимфоциты (рис. 10, б). В группах 2 и 3 инфильтрация сосудистой стенки и окружающих тканей отсутствовала, при этом собственные клеточные фрагменты не обнаружены (рис.10, в). К 7-м суткам после имплантации существенные изменения соединительнотканной структуры стенки артерий групп 2 и 3 не выявлены [19].

Через 4 недели после подсадки артерий контрольной группы начала формироваться грубая соединительнотканная капсула вокруг имплантата. Отмечены выраженная лимфоцитарно-макрофагальная реакция окружающих имплант тканей и прогрессирование инфильтрации сосудистой стенки (рис. 11, а). Имплантированные артерии, подвегнутые только замораживанию-отогреву, характеризовались формированием умеренной клеточной инфильтрации и появлением в сосудистой стенке участков макрофагальной инфильтрации. Соединительнотканные волокна имели несколько

разрыхленную структуру, при этом их целостность не нарушалась (рис. 11, б). В группе замороженных-облученных артерий выраженные клеточные реакции и инфильтрация не наблюдались. В сосудистой стенке отмечено формирование единичных макрофагальных «островков», что, как мы предполагаем, может быть проявлением врожденного иммунного ответа.

Через 8 недель после имплантации в контрольной группе наблюдали полное инкапсулирование имплантата, выраженное разволокнение коллагеновых и эластических волокон сосудистой стенки, что свидетельствовало о завершающейся биодеградации импланта. Определялись умеренная лимфоцитарно-макрофагальная реакция окружающих имплантат тканей реципиента и формирование множественных очагов кальцинации в толще сосудистой стенки. Выявленные изменения свидетельствуют о развитии хронической иммунной воспалительной реакции (рис. 12, а). Имплантированные лоскуты артерий группы 2 характеризовались склеротическими изменениями сосудистой стенки при сохранении умеренной клеточной инфильтрации окружающих тканей и массивным разрастанием соединительной ткани вокруг имплантата. Соединительнотканные волокна сосудистой стенки уплотнены, фиброзно изменены, вокруг имплантата формировалась грубая рубцовая соединительная ткань (рис. 12, б).

В имплантированных артериях, подвегнутых замораживанию-отогреву и облучению, сохранена структурная целостность, отме-

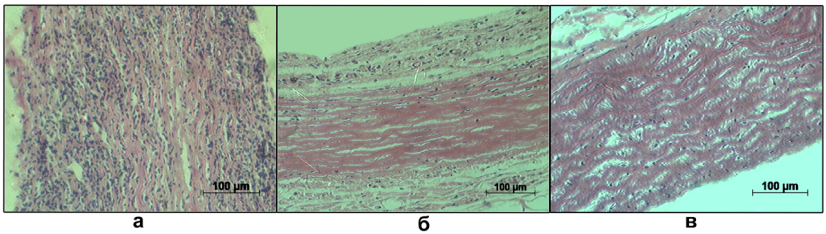


Рис. 11. Имплантация артерий под кожу животным через 4 недели: а – нативные артерии; б – после замораживания; в – после замораживания и облучения. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

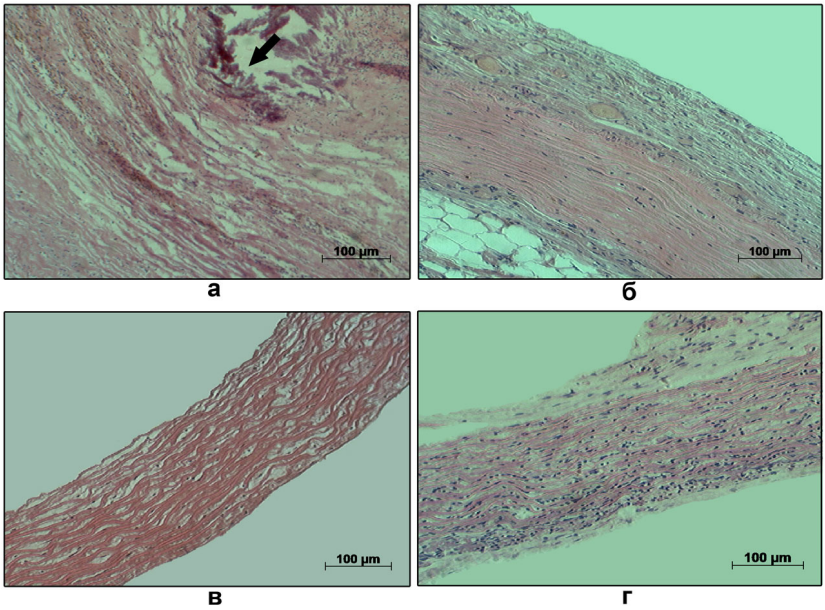


Рис. 12. Имплантация артерий под кожу животных. 8 недель после операции: а – нативные; б – после замораживания; в – после замораживания и облучения в дозе 25 кГр; г – после замораживания и облучения в дозе 50 кГр; стрелка – участок кальциноза. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

чено их заселение макрофагами и клетками фибробластического ряда, что свидетельствует об адаптивной модификации морфологии сосудистой стенки и отсутствии процессов биодеградации. Реакции воспаления и отторжения в них, а также в окружающих имплантат тканях отсутствовали (рис. 12, в, г). Существенных различий в группах 2 и 3 не отмечено. Результаты имплантации в группе 1 демонстрируют наличие острого иммуногенного воспаления, переходящего в хронический процесс. Реакция на замороженные-отогретые артерии менее выражена, чем в группе контроля, и проявлялась лишь в умеренной лейкоцитарной инфильтрации на ранних сроках наблюдения, что приводило к уплотнению и склерозированию волокон, разрастанию соединительной ткани вокруг

имплантата к 8-й неделе наблюдения. Таким образом, полученные результаты согласуются с литературными данными по влиянию низких температур на степень иммуногенности биологических тканей [20, 27]. Так, реакция тканей реципиента на имплантированные замороженные-отогретые артерии менее выражена по сравнению с реакцией на нативные ксенососуды. Однако с течением времени в группе контроля проявлялись признаки хронического иммунного воспаления. В группах артерий, подвергнутых девитализации (2 и 3), острых клеточных реакций не отмечено. Через 2 месяца после ксеноимплантации наблюдали заселение соединительнотканной стромы девитализированных лоскутов артерий фибробластами реципиента, что является признаком ремоделирования и доказывает их гипоиммуногенность.

Функциональность, гемосовместимость и степень тромбогенности девитализированных артерий *in vivo*

Для изучения морфогенеза, функциональности и биосовместимости ксенобиотрансплантата девитализированные артерии свиньи диаметром 2,5–3,0 мм и длиной 15–25 мм имплантировали в брюшную аорту кролика. Подготовку графта осуществляли следующим образом: девитализированный ранее протез в стерильном полимерном контейнере извлекали из низкотемпературного хранилища и отогревали на водяной бане при температуре 36°С. После полного отогрева графт помещали в стерильный физраствор с добавлением антибиотика и гепарина. Исследование проводили на 2-летних беспородных кролях массой 3200–4500 г. Нами выполнено12 операций сосудистого протезирования. Срок наблюдения составил 1 год, в течение которого у всех трансплантированных ксенопротезов сохранена функциональность. На всех сроках наблюдения экспериментальные животные сохраняли физиологическую активность. Животных выводили из эксперимента на 7, 15-е сутки, через 6, 9 и 12 месяцев после трансплантации, биоматериал эксплантировали, макроскопически оценивали структурную целостность девитализированного протеза, клеточные реакции и проводили гистологические исследования [12].

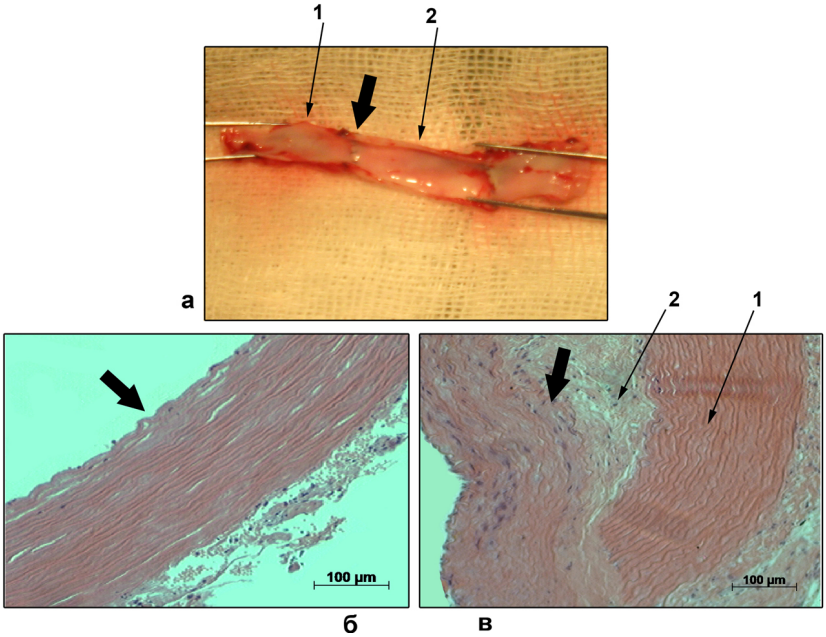


Рис.13. Девитализированный протез через 7 суток после трансплантации: а – макроскопическая картина люминальной поверхности протеза (1 – аорта кролика; 2 – протез; стрелкой обозначен анастомоз); б – ксенопротез (стрелкой указана люминальная поверхность протеза); в – зона сосудистого анастомоза (1 – протез; 2 – прослойка соединительной ткани; стрелкой указана аорта кролика). Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

Макроскопически через 7 суток после ксенотрансплантации анастомоз полностью сохранял состоятельность с обеих сторон, проленовые швы укрыты соединительной тканью, признаки деструктивно-некротических изменений отсутствовали. Стенка протеза эластичная, упругая, без деформации, стенозов и аневризматических расширений. Внутренняя поверхность протеза визуально не отличалась от люминальной поверхности аорты. Тромботические массы отсутствовали на всем протяжении (рис. 13, а). Реакции отторжения и иммуногенного воспаления не отмечались. Соединительнотканная структура протеза не повреж-

дена. Волокна сохраняли правильное пространственное ориентирование и непрерывность структуры, разрыхления и признаки биодеградации отсутствовали. Фрагменты разрушенных ГМК в стенке биопротеза не обнаружены. Структурная целостность ВЭМ сохранялась на всем протяжении, ее контуры были четкие и гладкие. На люминальной поверхности ксенопротеза отмечались единичных адгезированные клеточные элементы, преимущественно макрофаги. В области анастомозов определялись отдельные группы эндотелиоцитов. Адвентициальный слой представлен рыхлой соединительной тканью реципиента (рис. 13, б). Края протеза соединены со стенкой аорты тонкими прослойками новообразованной соединительной ткани, заполняющей пространство между швами (рис. 13, в).

Считается, что эндотелий магистральных сосудов является высокоспециализированным клеточным типом, который в процессе репаративного гистогенеза не возникает из соединительнотканных элементов и не трансформируется в них, а регенерирует за счет собственного камбия. При импрегнации серебром межклеточных границ выявлены очаги эндотелизации протеза со стороны зон анастомозов (рис. 14, а). Клетки имели вытянутую по ходу тока крови веретенообразную форму. Эндотелизация происходила путем роста сосудистого эндотелия непрерывным пластом и отдельными

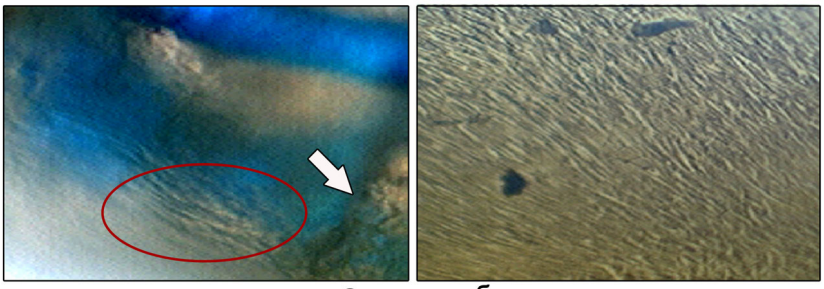


Рис. 14. Люминальная поверхность биологического протеза после трансплантации: а – 7-е сутки; б – 15-е сутки (овал – очаг реэндотелизации; стрелка – проксимальный край аорты). Импрегнация межэндотелиальных границ серебром, ×200.

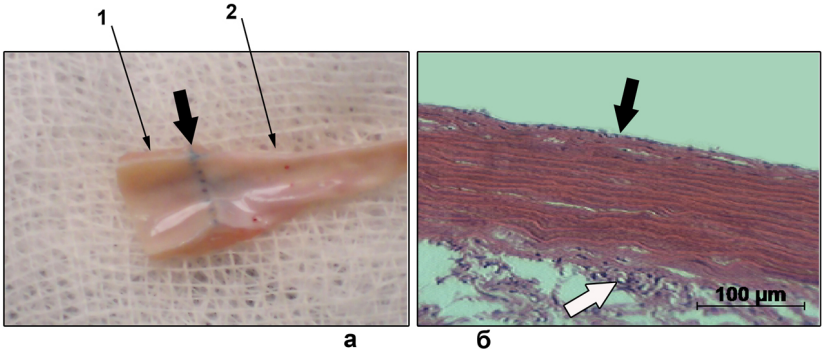


Рис. 15. Девитализированный протез через 15 суток после трансплантации: а – макроскопическая картина (1– аорта; 2 – протез; стрелкой обозначен анастомоз); б – ксенопротез (черной стрелкой указана люминальная поверхность протеза; белой стрелкой – капилляр *vasa vasorum*). Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

тяжами из сосудистой стенки аорты через анастомозы, при этом клетки не утрачивали связи друг с другом. В самой зоне роста клеточные границы имели незамкнутый характер.

Макроскопически к 15-м суткам послеоперационного периода анастомозы были полностью состоятельными, протез сохранял первоначальную форму и размеры, люминальная поверхность графта была гладкой и блестящей, некротических изменений не наблюдалось, пристеночные тромботические массы и признаки очаговых повреждений отсутствовали (рис. 15, а). При импрегнации серебром установлено, что неоэндотелиальный слой полностью покрывал внутреннюю поверхность протеза. Веретеновидные эндотелиоциты, ориентированные по току крови, равномерно располагались, формируя интимальную выстилку. Участки десквамации не обнаружены (см. рис. 14, б).

Мофологически соединительнотканная структура протеза полностью сохранялась, волокна сосудистой медии непрерывны, признаки лизиса и деструктивно-некротических изменений отсутствовали. Реакции воспаления и отторжения трансплантата не наблюдались. В области внутренней трети медии сосудистого

протеза отмечались единичные клеточные элементы, преимущественно макрофаги и клетки фибробластического ряда. На люминальной поверхности девитализированного графта ВЭМ сохраняла целостность, на которой визуализировались множественные группы эндотелиоцитов, что свидетельствуют о формировании неоинтимы. Адвентициальный слой представлен рыхлыми соединительнотканными волокнами, между которыми выявлялись капилляры формирующейся вокруг биопротеза сети *vasa vasorum* (рис. 15, б).

Через 6 месяцев наблюдения края девитализированного протеза полностью срослись со стенкой аорты и сохранили первоначальную форму. Люминальная поверхность графта не отличалась от поверхности аорты, имела бледно-розовый цвет, была гладкая, блестящая, без признаков деструкций, очагово-некротических изменений и пристеночных тромботических масс (рис. 16, а). Неоэндотелий сохранял однородность и непрерывность на всем протяжении (см. рис.15). Гистологическое исследование девитализированных протезов продемонстрировало полностью сформированную неоинтиму протеза с четким дифференцированием эндотелиальной выстилки, подэндотелиальным слоем и ВЭМ. Дефекты неоинтимы отсутствовали на всем протяжении протеза. Соединительноткан-

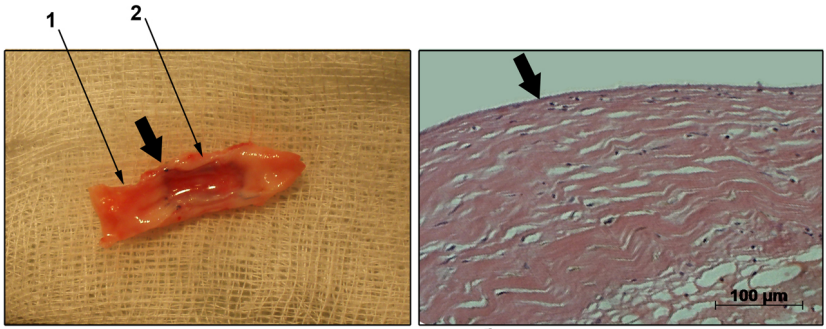


Рис. 16. Девитализированный протез через 6 месяцев после трансплантации: а – макроскопическая картина (1– аорта; 2 – протез; стрелкой указан анастомоз); б – ксенопротез (стрелкой указана люминальная поверхность протеза); окраска гематоксилином и эозином, ×200.

ные волокна сосудистой медии полностью сохраняли структурную организацию, при этом отмечалось заселение внутреннего слоя протеза собственными ГМК реципиента. Следует также отметить наличие единичных макрофагов в толще сосудистой стенки, что свидетельствовало о продолжающемся процессе ремоделирования биопротеза. Адвентициальный слой представлен рыхлой соединительной тканью и единичными капиллярами сети *vasa vasorum*. Реакции воспаления и отторжения отсутствовали на всем протяжении биопротеза, включая зоны анастомоза (рис. 16, б).

Через 9 месяцев после операции биопротез визуально не отличался отаорты. Стенка графта сохраняла упругость и эластичность, признаки деструктивно-некротических изменений отсутствовали. Ксенопротез и прилегающие участки аорты были окружены рыхлой, васкуляризованной, легко разделяемой соединительной тканью. Рубцовые изменения стенки протеза и прилегающих тканей отсутствовали. Люминальная поверхность графта была бледно-розового цвета, гладкая и плавно переходила в стенку аорты (рис. 17, а). По данным оптической микроскопии морфоструктура сосудистой стенки биопротеза представлена хорошо организованными соединительнотканными волокнами, в медиальном слое

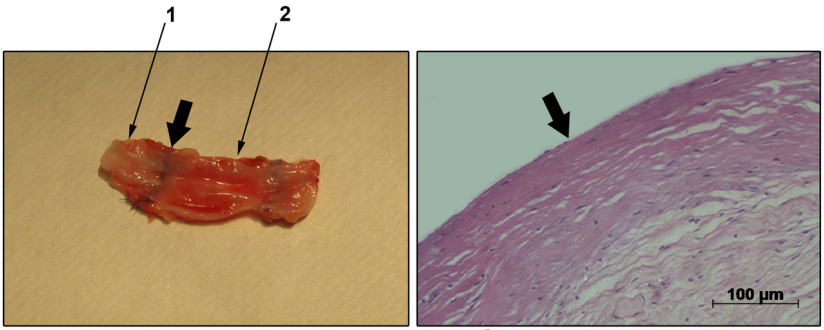


Рис. 17. Девитализированный протез через 9 месяцев после операции: а – макроскопическая картина (1 – аорта; 2 – протез; стрелкой указан анастомоз); б – ксенопротез (стрелкой указана люминальная поверхность); окраска гематоксилином и эозином, ×200.

выявлялись единичные макрофаги, миофибробласты и ГМК. На всем протяжении графта признаки отторжения, деструктивно-некротические изменений и расслоение отсутствовали. Интима состояла из непрерывной ВЭМ, на которой определялись множественные группы эндотелиоцитов. Адвентициальный слой протеза представлен рыхло расположенными соединительнотканными волокнами с хорошо выраженной капиллярной сетью (рис. 17, б).

Максимальная длительность наблюдения после трансплантации девитализированных артерий без применения антикоагулянтных и антиагрегатных препаратов составила год, в течение которого биопротезы адекватно функционировали, обеспечивая достаточное кровоснабжение. При этом на всех сроках наблюдения деструктивно-некротические изменения стенок ксенопротеза и окружающих тканей, признаки отторжения, иммуногенного воспаления, фиброзно-рубцового перерождения соединительнотканной структуры не отмечены. Соединительнотканные волокна девитализированных протезов сохраняли целостность и упорядоченность. В процессе морфогенеза происходило ремоделирование девитализированных ксенососудов, которое проявлялось адаптивной модификацией функции и морфологии ксенобиопротеза: образовывался слой собственных эндотелиальных клеток; в средней оболочке наблюдались ГМК и миофибробласты, ответственные за сокращение и расслабление сосудистой медии; внешняя оболочка (адвентиция) содержала волокна ГМК, фибробласты, сеть мелких артерий, связанных с периадвентицией и жировой тканью. Полученные результаты свидетельствовали о полной интеграции девитализированного ксенопротеза в организм реципиента, полноценной функциональности, гемо- и биосовместимости, а также устойчивости к структурной и кальциевой дегенерации, что с точки зрения патофизиологии означает обретение биологической структурой новой функции [12, 4].

Таким образом, результаты проведенных исследований (оценка биомеханических свойств ксенотрансплантата, характера морфологических изменений артериальной стенки, биосовместимости, степени иммуногенности и морфогенеза) позволяют считать спо-

соб предымплантационной обработки нативных ксеноартерий низкими температурами и облучением потоком электронов пригодным для создания сосудистого биопротеза. Впервые предложенный нами метод криорадиационной обработки является новым подходом к девитализации ксеноартерий малого диаметра. Существенные преимущества данного метода заключаются в полноценной бактериологической и вирусной стерилизации ксеноткани, а также возможности длительного хранения девитализированных ксеногенных артерий [15].

Мы получили биологически инертный пластический материал с предельно низкими антигенными свойствами для регенеративной хирургии, который сохраняет структуру и композицию нативных сосудов с прочностными характеристиками, близкими к нативной ткани. Эластичность девитализированных ксеногенных артерий обеспечивает герметичность и функциональность анастомозов, при этом отсутствует необходимость применения длительной антикоагулянтной терапии. На месте имплантации обеспечивается селективный рост тканей без признаков рубцевания или инкапсуляции, а также без развития реакций отторжения и иммуногенного воспаления.

Полученные результаты обуславливают целесообразность проведения доклинических и клинических исследований, которые позволят внедрить девитализированные ксеноартерии в хирургическую практику, а также для проведения комплекса работ по созданию криобанка ксенобиопротезов малого диаметра.

Литература

1. Ахмедов Ш.Д., Афанасьев С.А., Дьякова М.Л. и др. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, №2. – С.32–39.
2. Бокерия Л.А., Гасанов А.Ф., Каграманов И.И. и др. Экспериментальное обоснование возможности применения артерии и вены пуповины человека в качестве кондуитов // Здоровье. – 2007.– №10. – С.147–156.
3. Бокерия Л.А., Ступаков И.Н., Самородская И.В. и др. Мнение врачей первичного звена в оценке потребности пациентов в хирургических методах лечения ишемической болезни сердца // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – №1. – С. 10–15.

4. Бизов Д.В. Застосування низьких температур для створення девіталізованих судинних скафолдів : Автореф. дис. …. канд. мед. наук. – Харків, 2012. – 20 с.
5. Бызов Д.В., Михайлова И.П., Сынчикова О.П., Сандомирский Б.П. Низкотемпературная обработка как первый этап создания бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов // Проблемы криобиологии.– 2009.– Т. 19, №2. – С. 214.
6. Бызов Д.В., Пушкова Е.Н., Сынчикова О.П. и др. Низкотемпературная обработка и гамма–облучение применительно к созданию девитализированных сосудистых скаффолдов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. 12 (приложение) – С. 304–305.
7. Бызов Д.В., Пушкова Е.Н., Сынчикова О.П. и др. Низкие температуры и гамма-облучение применительно к созданию девитализированных сосудистых скаффолдов: Труды XIX Международ. конф. по физике радиационных явлений и радиационному материаловедению, 6–11 сентября. – Алушта, 2010.– С.471–472.
8. Бызов Д.В., Репин Н.В., Марченко Л.Н. и др. Ультраструктура артерий после девитализации низкими температурами и ионизирующим облучением // Проблемы криобиологии. – 2011.– Т. 21, №2. – С. 137–146.
9. Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Влияние ионизирующего облучения на артерии свиньи при создании девитализированных скаффолдов // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №6. – С. 75–79.
10. Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Применение низких температур для создания ксеногенных сосудистых скаффолдов // Биотехнология. – 2010.–Т. 3, №1.–С.41–45.
11. Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Пушкова Е.Н. и др. Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №3. – С. 21–30.
12. Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П. и др. Девитализированные сосудистые протезы, исследование in vivo//Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. 12, №4. – С. 81–90.
13. Кондаков І. К., Яковцова А. Ф., Гавриш О. С. Способи оцінки морфо-функціонального стану ендотелію: Метод. рекомендації. – Харків–Київ, 2000. – 19 с.
14. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975.– 324 с.
15. Пат. 68379 Україна, МПК A61L 27/00, A01N1/02.Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування / Сандомирський Б.П., Бизов Д.В., Михайлова І.П. та ін.; заявник и патентовласник ІПКіК НАНУ.– № U2011 10193; заявл. 19.08.2011, опубл. 26.03.2012, Бюл. №6.
16. Bailey A.J., Rhodes D.N., Cater C.W. Irradiation-induced crosslinking of collagen // Radiat. Res. – 1964. – №22. – P. 606–621.
17. Borschel G., Huang Y.-C., Calve S. et al. Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts // Tissue Eng. – 2005. – Vol.11, №5–6. – P.778–786.
18. Byzov D.V., Sandomirsky B.P. Creation of devitalization vascular prostheses of small diameter // Int. J. Artif. Org.– 2011. – Vol. 34, №8. – P. 708.
19. Byzov D.V., Synchykova O.P., Mikhailova I.P.et al. Freezing and gamma-radiation for devitalizationof vascular scaffolds // Cryobiology. – 2010. – Vol. 61, №3.– P. 389.
20. Cui X., Labarrere C., He L. et al. Cryopreservation and microsurgical implantation of rabbit carotid arteries // Cell Preserv. Tech.– 2002. – Vol. 1, №2. – P. 121–128.
21. Dahl S. L. Feasibility of vitrification as a storage method for tissue-engineered blood vessels // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12, №2. – P. 291–300.
22. Grant R., Cox R., Kent C. The effects of gamma irradiation on the structure and reactivity of nativeandcross–linkedcollagenfibres // J. Anat. – 1973. – Vol. 115, №1. – P. 29–43.
23. Henner W.D., Rodriguez L.O., Hecht S.M., Haseltine W.A. Gamma ray induced deoxyribonucleic acid strand breaks. 3'Glycolate termini // J Biol. Chem. – 1983. – Vol. 25, №258. – P.711–713.

24. Ota T., Taketani S., Iwai S. et al. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation. // Ann. Thorac. Surg. – 2007. – Vol. 83, N4. – P. 1501–1507.
25. Sandomirsky B.P., Byzov D.V., Synchykova O.P., Mikhailova I.P. Cryodamage as the first stage in creation of biological vascular prostheses // CryoLetters. – 2010. – Vol. 31, №2. – P. 192.
26. Schmidt C.E., Baier J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21, №2. – P. 2215–2231.
27. Solanesa N., Riqola M., Castella M. et al. Cryopreservation alters antigenicity of allografts in a porcine model of transplant vasculopathy // Transplant Proc. – 2004. – Vol. 1, №36. – P. 3288–3294.
28. Taylor L.M., Edwards J.M., Porter J.M. Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series // J. Vasc. Surg. – 1990. – Vol. 11, N2. – P. 193–205.
29. Teebken O.E., Bader A., Steinhoff G. et al. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2000. – Vol. 19, №4. – P. 381–386.
30. Vasin S.L., Rosanova I.B., Sevastianov V.I. The role of proteins in the nucleation and formation of calcium–containing deposits on biomaterials surface // J. Biomed. Mater. Res.– 1998.– Vol. 1, №39. – P. 491–498.
31. Weadock K., Olson R.M., Silver F.H. Evaluation of collagen crosslinking techniques // Biomater. Med. Dev. Artif. Org. – 1984. – Vol. 11, №4. – P. 293–318.

Влияние охлаждения на структурно-функциональное состояние гематоэнцефалического барьера

В.Г. Бабийчук, В.С. Марченко*, Г.А. Бабийчук

Отдел криофизиологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: marchik@list.ru*

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является предметом исследования не одного поколения учёных [15, 22, 24, 39, 50]. Для криобиологии и криомедицины актуально изучение терморегуляторных механизмов ГЭБ, как структурно-функциональной основы медленной управляющей системы мозга (МУС) [2, 3, 26]. Научные положения о МУС, разработанные Н.А. Аладжаловой [2, 3], в настоящее время успешно развиваются исследователями научной школы академика Н.П. Бехтеревой [21, 33]. К сожалению, большинство положений этой концепции не опиралось на сколько-нибудь конкретную морфологическую основу. Авторы ограничились лишь отдельными замечаниями, выделив лимбико-гипоталамические образования, в которых при взаимодействии нейроглиальных элементов и межклеточной электрической матрицы (гиалуроновой кислоты) в неравновесных условиях могут возникать колебательные процессы с частотой ниже 0,5 Гц [3]. Положения о медленных управляющих механизмах мозга были сформулированы на основе анализа динамических характеристик сверхмедленной биоэлектрической активности. Вместе с тем в работе Е.М. Белявского и др. [14], результаты которой полностью согласуются с нашими данными [26–28], подтверждена важная роль ГЭБ в генезе сверх-

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 655–704.
© В.Г. Бабийчук, В.С. Марченко, Г.А. Бабийчук, 2012

Используемые сокращения

ΔX – вариационный размах
I_k – второе значение функции автокорреляции
НО-1(2) – гемоксигеназа-1(2)
NOS – NO-синтаза
m_0 – аргумент первого отрицательного значения функции автокорреляции;
S_m – медленные волны первого порядка
S_0 – медленные волны второго порядка
АМо – амплитуда моды
АХ – ацетилхолин
ВПР – вегетативный показатель ритма
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ЗГТ – задний гипоталамус
ИВР – индекс вегетативного равновесия
ИН – индекс напряжения регуляторных систем
КА – катехоламин
КП ^{3}Н-НА и ^{3}Н-СТ – коэффициенты проницаемости ГЭБ для ^{3}Н-норадреналина и ^{3}Н-серотонина
КЦГ – краниоцеребральная гипотермия
Мо – мода
МУС – медленная управляюшая система
НА – норадреналин
ПГТ – передний гипоталамус
РГВ – ритмическое гипотермическое воздействие
РЭХВ – ритмическое экстремальное холодовое воздействие
СМК – сенсомоторная кора
СТ – серотонин
ЦНС – центральная нервная система
ЧСС – частота сердечных сокращений
ЭБС – эмоционально-болевой стресс
ЭЭС – экзисто-энцефалическая система

медленной ритмики. Обобщающий труд о сверхмедленных процессах увидел свет в 1962 году [2], в это же время были опубликованы первые монографии, посвященные исследованию ГЭБ [22, 39]. В настоящее время оба направления получили полное признание и, по нашему убеждению, будут в дальнейшем объединены в научную концепцию, раскрывающую их роль в механизмах поддержания гомеостаза организма человека и животных. Можно предположить, что структурной основой медленной регуляции мозга являются элементы ГЭБ, динамика проницаемости которого при гипотермических воздействиях полностью отвечает основным признакам [3] медленной управляющей системы.

МУС и ГЭБ включаются в процессы регулирования, когда реакции других функциональных систем перестают быть оптимальными. МУС вырабатывает новые программы для быстродейст-

вующей системы мозга, которая определяет почти мгновенные реакции на кратковременные, случайные или давно известные воздействия [3].

Проницаемость ГЭБ, как и уровень сверхмедленной биоэлектрической активности, повышается при систематически повторяющихся воздействиях или в ответ на длительные, чрезмерные для организма раздражители. Функциональные системы ГЭБ и МУС слабо реагируют на кратковременные или случайные возмущения. Так, по мере увеличения интенсивности и специфичности холодовых воздействий в ряду: КЦГ – 0,1КЦГ – ζКЦГ (краниоцеребральная гипотермия непрерывного действия, КЦГ с частотой односекундных холодовых воздействий 0,1Гц, КЦГ с частотой холодовых воздействий, модулированных обратной связью по секундному ζ-ритму биоэлектрической активности мозга, соответственно) увеличивается проницаемость ГЭБ (рис. 1, а) однонаправленно с пространственной когерентностью секундного биоэлектрического ритма (рис. 1, г). Причем на любой стадии воздействия ослабление интенсивности охлаждения (повышение температуры при КЦГ) или специфичности (сбой ритма при 0,1КЦГ и ζКЦГ) приводит к резкому снижению проницаемости ГЭБ и пространственной синхронизации сверхмедленной активности МУС.

Скрытый период реакции ГЭБ и МУС может исчисляться минутами и часами, а изменения в активности сохраняются в течение нескольких суток [2, 3, 15, 26].

Авторы теории МУС только декларировали, что она опирается на систему с изменяющейся структурой [3], тогда как активация ГЭБ при гипотермии наглядно это демонстрирует. Показано, что при гипотермических воздействиях происходят специфические изменения ультраструктуры эндотелиоцитов капилляров мозга, резко увеличивается количество пиноцитозных везикул (рис. 1, д) в том числе покрытых клатриновой оболочкой (рис. 1, е), т. е. активируется как неспецифический, так и рецептор-индуцируемый трансцитоз [29]. Это способствует повышению избирательной проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов, участвующих в теплопродукции, например норадреналина (НА), но не для нейротрансмиттеров, опосредующих теплоотдачу, таких как серотонин (СТ) (рис. 1, а, в).

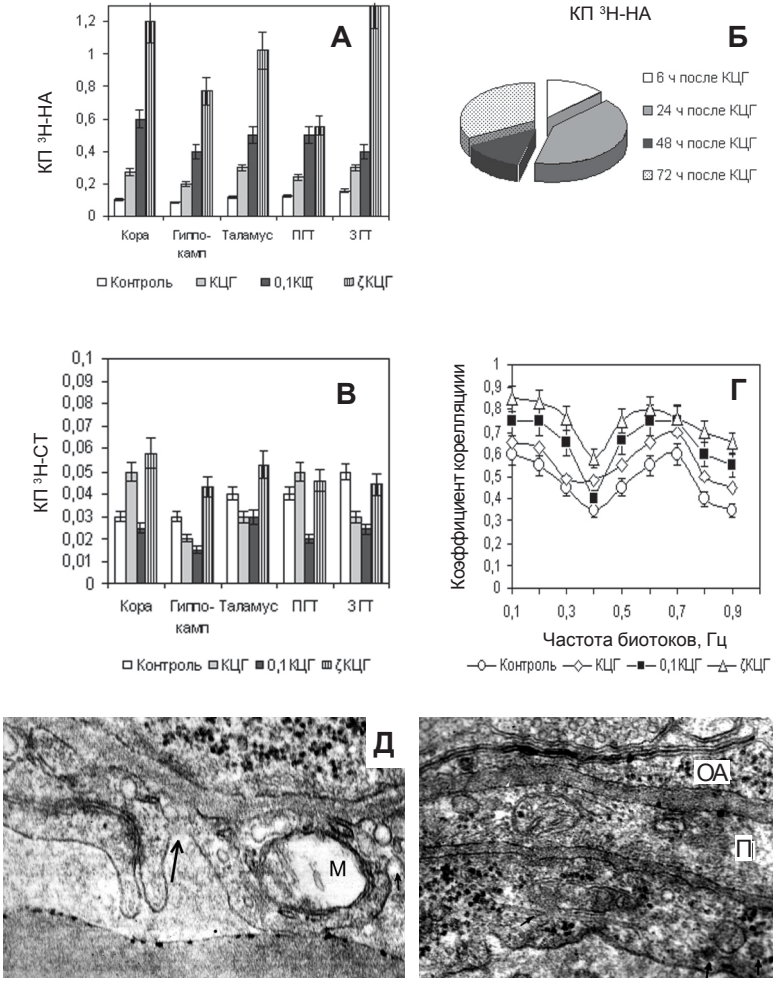


Рис. 1. Структурно-функциональные характеристики ГЭБ при охлаждении: А, Б, В – проницаемость ГЭБ (ПГТ, ЗГТ – передние и задние отделы гипоталамуса; КП ^{3}Н-НА и ^{3}Н-СТ – коэффициенты проницаемости ГЭБ для ^{3}Н-норадреналина и ^{3}Н-серотонина, определяемые как отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови); Г – график функции когерентности биотоков мозга (КК – коэфициент корреляции); Д, Е – электронограммы фрагментов капилляров (П – перицит; М – митохондрии; ОА – отросток астроцита; стрелка указывает на пиноцитозные везикулы).

МУС и ГЭБ характеризуются вовлечением многих структур и функциональных систем мозга в ответ на «предъявление» нового систематического возмущения. Ультраструктурные изменения, увеличение проницаемости для термокомпетентных нейромедиаторов и пространственной когерентности сверхмедленной биоэлектрической активности характерны для всех изученных структур головного мозга (рис. 1).

Результат регулирования МУС заключается в выборе новых параметров системы для перехода на новый уровень активности, в новую область устойчивости. Иначе говоря, функционирование МУС направлено на то, чтобы перевести существенные параметры организма в область физиологически благоприятных значений для работы с предвидением действия сходных факторов окружающей среды в будущем [3]. Наши данные свидетельствуют, что от функциональной активности ГЭБ зависит протекание обнаруженной нами так называемой «реакции ожидания гипотермии», которая формируется приблизительно через сутки после КЦГ. Эта системная приспособительная реакция, готовящая организм к повторной встрече с данным воздействием, на нейрохимическом уровне заключается в формировании комплекса условий, обеспечивающих сохранение активности ключевых нейромедиаторных систем после их усиленного функционирования. Например, уже через 6 ч после КЦГ наблюдается устойчивая тенденция к нормализации синаптической передачи и проницаемости ГЭБ, но приблизительно через сутки в эутермных условиях происходит повторное снижение активности нейрохимических процессов, приводящих к уменьшению уровня норадреналина и повышению проницаемости ГЭБ для катехоламинов (рис. 1, Б).

Таким образом, основные признаки медленной управляющей системы присущи ГЭБ. Проблема заключается не в том, являются или нет структурные элементы барьера основой медленной регуляции, а в том, при каких условиях ГЭБ может оказаться функциональной системой медленного управления суммарной активностью мозга. И все же медленная управляющая система – более широкое понятие [3], а ГЭБ во многих случаях удобнее рассматривать традиционно [15, 24], однако и наши представления об участии ГЭБ в регуляторных механизмах медленной управляющей систе-

мы мозга кажутся оправданными. Поэтому мы предлагаем ввести термин – «экзистоэнцефалическая функция ГЭБ» или «экзистоэнцефалическая система» (ЭЭС).

Понятие «экзистенция», понимаемое как существование на грани возможного, всё чаще используется в теоретической биологии (например, в концепции жизни Сантьяго [31], разделяемой многими классиками современной нейробиологии) и может быть перенесено из сферы философии в область физиологии экстремальных состояний и криофизиологии (в частности для понимания общих закономерностей перехода организма на гипометаболический уровень функционирования).

Роль ГЭБ как структурной основы медленной управляющей системы охлаждённого мозга в развитии стресса как общего адаптационного синдрома

Объединение понятий МУС и ГЭБ в ЭЭС привело к пониманию того, что ГЭБ, как морфологический субстрат МУС, включается в процессы регуляции, когда возмущающее воздействие чрезмерно или систематично, т. е. при действии стрессоров. Очевидно, ЭЭС активируется при стрессовых ситуациях. Тогда возникает вопрос, как соотносится концепция стресса с гипотезой ЭЭС?

В настоящее время большинство исследователей считают, что нейроэндокринная реакция организма на отличающиеся стрессоры различна. Например, перегревание вызывает у человека генерализованную эндокринную реакцию, при которой экстремально повышается содержание циркулирующего пролактина, а охлаждение при 4°С существенно повышает в плазме только концентрацию НА [34]. У крыс специфичность стрессорного ответа подтверждается снижением некоторых эндокринных реакций на определенный стрессор у адаптированных животных при сохранении реакции (по типу неадаптированных животных) – на другой раздражитель [34, 55]. Тем не менее в теории стресса, как адаптационного синдрома с переменным доминированием катаболических или анаболических процессов, можно выделить общую для всех стрессорных факторов неспецифическую особенность, которую некоторые авторы называют «законом волнообразности адаптационного процесса» [44]. Известно, что термин «стресс»

был заимствован из физики. Любая физическая динамическая система, выведенная из равновесия, совершает колебательные движения. Однако живые организмы в процессе эволюции приобрели способность регулировать свои колебательные процессы. Г. Селье различал стадии тревоги, резистентности и истощения при активации системы гипоталамус – передняя доля гипофиза – кора надпочечников с характерными проявлениями стресса: гипертрофия надпочечников, инволюция вилочковой и лимфатических желез, язвенные поражения слизистой оболочки желудка и др. [41]. В настоящее время показано, что при стрессе изменяется большинство физиологических функций организма: эндокринные, половые, сердечно-сосудистые, кислород-обеспечивающие, иммунные, психические и др., т. е. стресс является системной реакцией организма [32, 44]. Эти изменения имеют ярко выраженный ритмический характер, как и реакции организма на экстремальные температурные воздействия. Так, у спортсменов при большой физической нагрузке в условиях воздействия отрицательных температур отмечены волнообразные изменения экскреции оксикортикостерои-дов с мочой, причем сначала усиливается адренокортикальная активность коры надпочечников, которая затем сменяется угнетением глюкокортикоидной функции, но в дальнейшем активность вновь повышается. Активность коры надпочечников уменьшается не в результате истощения, а вследствие межорганных регулирующих влияний, тормозящих продукцию глюкокортикоидов [16]. У крыс при гипотермии, вызванной гипокинезией, регистрировали волнообразные изменения функциональной активности нейросекреторных клеток супраоптического ядра гипоталамуса. Морфологические изменения наблюдались через 3 ч, на 20-е сутки картина соответствовала контролю, а на 30-е сутки отмечалась вторая волна активации [23]. При погружении крыс в холодную воду (7°С) на 15 с через 1 ч в 2 раза повышалась секреция кортикостерона, к 12-му часу она была в 4 раза ниже контрольных значений, а к 60-му часу после воздействия – в 2 раза выше [63]. У собак в условиях длительного пребывания при низких температурах обнаружено волнообразное изменение секреции 17-оксикортикостероидов: сначала секреция усиливалась, затем колебалась, причем в фазе минимума она уменьшалась почти до нуля [60].

При длительном общем охлаждении животных (в течение 35 суток) в гипоталамусе обнаружено колебание содержания кортикостерона с повышением выше контрольного уровня и снижением до исходного [49]. Эти примеры реакции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы на острое и хроническое воздействие стрессорных, в том числе и температурных факторов, свидетельствуют о её колебательном характере. В начальном периоде как острого, так и хронического раздражения отмечается активация всех звеньев системы, сменяющаяся чередованием фаз угнетения и мобилизации [44]. Необходимо сослаться на важную с нашей точки зрения работу [61], в которой отмечены колебательный характер пара- и симпатического тонуса и «полное вегетативное переключение» при различных экстремальных воздействиях. Автор не абсолютизирует свою схему, справедливо признавая возможность сложной динамики чередования пара- и симпатических реакций в зависимости от интенсивности и качества раздражителя, что подтверждено в работах других исследователей. При охлаждении крыс до температуры тела 19°С с интервалами 3–5 суток регистрировали сложную динамику содержания аминокислот головного мозга. После первого сеанса гипотермии содержание гамма-аминомасляной и аспарагиновой кислот снижалось, после 7-го сеанса возрастало, а после 13-го сеанса наблюдалось вторичное снижение концентрации этих веществ [51]. Если крыс помещали в условия с низкой температурой окружающей среды (5°С), то в течение 50 мин у них увеличивалось содержание СТ, а после 180-минутной экспозиции его концентрация в крови была ниже, чем в контроле. Аналогично изменялось содержание СТ в стенке желудка [43] и в головном мозге при охлаждении в условиях иммобилизационного стресса [71]. Волнообразные феномены наблюдаются и в биоэлектрической активности различных отделов головного мозга. Сообщается о периодических характерных паттернах биоэлектрической ритмики гипоталамуса кроликов в процессе длительного охлаждения, при котором происходят двухфазные изменения содержания кортикостерона в надпочечниках: первоначальное снижение с последующим увеличением до 253% [49]. Сходная волнообразная динамика характерна для артериального давления в условиях охлаждения переднего, промежуточного,

среднего и продолговатого мозга собак [53]. Создается впечатление, что практически в любой работе, посвящённой изучению проблемы стресса [8, 9, 41, 44, 45, 59], можно найти многочисленные свиде-тельства волнообразности протекания общего адаптационного синдрома – увеличение периода и амплитуды исходного ритма с последующим затуханием колебаний и дальнейшим восстановлением исходной ритмики.

Необходимо отметить существенные различия результатов, полученных разными авторами относительно частоты и длительности таких колебаний (от нескольких секунд и минут до часов и суток), которые могли быть связаны не с разной постановкой экспериментальных воздействий, а с индивидуальными особенностями течения адаптационного синдрома, обусловленными исходным состоянием организма (вегетативный статус, возраст и т. п.). Кроме того, анализ обширной научной литературы по проблематике стресса свидетельствует о недостаточном исследовании роли ГЭБ охлаждённого мозга в механизмах организации ритмики общего адаптационного синдрома.

В этой связи нами было проведено сравнительное исследование биоритмики функционирования ГЭБ при стрессе и холодовых воздействиях у крыс разного возраста и вегетативного статуса.

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что при стрессах разного генеза существенно повышается проницаемость ГЭБ. Поэтому оправданно ввести в современные концепции общего адаптационного синдрома [41] представления о функциональной активности ГЭБ. При некоторых состояниях организма проницаемость барьера повышается для многих биологически активных веществ. Это может привести к изменению постоянства внутренней среды мозга, вызвать компенсаторные реакции организма в системах кровообращения, дыхания, терморегуляции и т. п. В этой связи для коррекции патологического напряжения функциональных систем организма можно использовать явления перекрестной адаптации к стрессорам разной модальности и интенсивности. Такого рода вопросы целесообразно изучать на сердечно-сосудистой системе при гипотермии, полагая, что различные программы охлаждения могут стимулировать разные симпато-парасимпатические взаимодействия. В последние годы успешно развиваются

новые терапевтические методы лечения, направленные на активацию собственных защитных систем организма [28]. К ним относится резонансная терапия, использующая с лечебной целью различные виды сенсорной стимуляции с точно подобранными частотными параметрами, соответствующими индивидуальным биоэлектрическим осцилляторам [47]. Лечебная гипотермия с учетом индивидуальных особенностей секундной биоэлектрической активности головного мозга может оказаться эффективным методом стимуляции нервной и сердечно-сосудистой систем организма при повышении функциональной активности ГЭБ. Этот метод является наиболее актуальным при коррекции нарушений центральных механизмов регуляции сердечно-сосудистой системы старого организма, у которого регуляторные системы функционируют менее эффективно.

В качестве индикатора адаптационных реакций организма на охлаждение и эмоционально-болевой стресс (ЭБС) мы использовали следующие физиологически значимые показатели частоты сердечных сокращений (ЧСС): мода *Mo*; амплитуда моды *AMo*; вариационный размах ΔX; индекс напряжения регуляторных систем $ИН = AMo/2\Delta XMo$; индекс вегетативного равновесия $ИВР = AMo/\Delta X$; вегетативный показатель ритма ВПР = 1/МоΔХ; I_k – второе значение функции автокорреляции; m_0 – аргумент первого отрицательного значения функции автокорреляции; S_m – медленные волны первого порядка; S_0 – медленные волны второго порядка [13].

В нашем случае значение *Mo* свидетельствует о наиболее вероятном уровне функционирования синусового узла системы кровообращения, в основном это гуморальный путь регуляции. Значение *AMo* отражает мобилизующий эффект централизации управления ритмом сердца под влиянием симпатического отдела вегетативной нервной системы. Значение ΔX связано с активностью парасимпатической нервной системы (влияние блуждающих нервов на дыхательные изменения сердечного ритма обычно преобладает над недыхательными). Следует учитывать, что при повышении амплитуды медленных волн ΔX будет зависеть от состояния подкорковых нервных центров больше, чем от тонуса парасимпатической нервной системы. Показатель *ИВР* указывает

на соотношение активности симпатического и парасимпатического отделов ЦНС; *ИН* отражает степень централизации управления сердечным ритмом.

Эти параметры мы дополнили показателями спектрально-корреляционного анализа сверхмедленной биоэлектрической активности, что позволило непосредственно судить об активности корково-подкорковых систем в динамике стресса. Кроме того, было изучено состояние важнейшего звена системы обратных связей – ГЭБ, проницаемость которого оценивалась радиоизотопным методом [10].

По исходным показателям ЧСС различали животных с преобладанием тонуса парасимпатической и симпатической нервной системы, равновесием вегетативного гомеостаза. Среди крыс после 3-недельного ЭБС выделилось 3 группы: 1 – погибли в течение недели после прекращения воздействия ЭБС; 2 – тяжелое состояние (адинамичные, легковозбудимые); 3 – удовлетворительное состояние.

Животные группы 3 перед ЭБС имели слабое напряжение регуляторных механизмов, сдвиг вегетативного гомеостаза в парасимпатическую сторону, более низкий тонус нервного канала регуляции и значительно увеличенный вариационный размах. На 21-е сутки стресса наблюдались достоверный сдвиг вегетативного гомеостаза в симпатическую сторону и повышение тонуса регуляторных механизмов в основном за счет уменьшения ΔX.

Крысы группы 2 перед ЭБС имели равновесие вегетативного гомеостаза, среднее напряжение регуляторных механизмов, средние значения *АМо*, ΔX. На 21-е сутки стресса у животных этой группы также наблюдались выраженный сдвиг вегетативного гомеостаза в симпатическую сторону и значительное повышение напряжения регуляторных механизмов.

У крыс группы 1 перед ЭБС было сильное напряжение регуляторных механизмов и значительное преобладание тонуса симпатической нервной системы. На 21-е сутки стрессового воздействия показатели статистического анализа сердечного ритма существенно не изменились, отмечено лишь некоторое повышение тонуса симпатической нервной системы и напряжение регуляторных механизмов.

По статистическим показателям кардиоинтервалов в динамике развития ЭБС существенных возрастных отличий выявлено не было (табл. 1). На основании анализа результатов проведенных исследований можно заключить, что животные, обладающие высоким напряжением регуляторных механизмов, повышенным тонусом симпатической нервной системы, наиболее устойчивы к относительно кратковременным стрессам и наименее устойчивы к более длительным. Крысы, имеющие низкое напряжение регулятор-

Таблица 1. Статистические показатели ЭКГ крыс с разной устойчивостью к стрессу

Показатели		Группы		
		1	2	3
Mo	К	120 ± 2	122 ± 3	121 ± 5
	ЭБС	123 ± 3	121 ± 3	128 ± 5
AMo	К	33,5 ± 3	23,4 ± 2,1	15,5 ± 1,4
	ЭБС	32 ± 4	31 ± 4*	21 ± 3*
DX	К	6 ± 1	7 ± 1,5	10 ± 2
	ЭБС	6,5 ± 0,5	6,5 ± 0,7	8,9 ± 1
ИВР	К	5,2 ± 0,5	3 ± 0,3	1,3 ± 0,3
	ЭБС	5,5 ± 1	5,3 ± 0,8*	3 ± 0,5*
ИН	К	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,005 ± 0,00001
	ЭБС	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001*	0,01 ± 0,001*

Примечание: * – различия при ЭБС по сравнению с контролем (К) достоверны ($P < 0,05$).

ных механизмов и повышенный тонус парасимпатической нервной системы, наименее устойчивы на первых стадиях стресса, но выживают при длительном ЭБС. Крысы с равновесием вегетативного гомеостаза и средним напряжением регуляторных механизмов имеют среднюю устойчивость на всех стадиях ЭБС.

Процессы адаптации и лабилизации, возникающие в системе управления, приводят к повышению активности подкорковых центров, участвующих в регуляции ритма сердца. Результатом перенапряжения нервных центров является иррадиация возбуждения на соседние центры, в том числе активация нижележащих уровней управления. При этом наблюдаются однонаправленные изменения регуляторных показателей, повышается тонус симпатического и парасимпатического отделов автономной нервной системы. У крайне неустойчивых к ЭБС погибших животных отмечались дискоординированные изменения показателей (например, увеличение *Mo* при уменьшении ΔX или одновременное повышение медленных и дыхательных волн сердечного ритма), указывающие на неудовлетворительную адаптацию. Можно сделать вывод, что процессы адаптации к ЭБС зависят не только от функционального резерва организма, но и от активности стратегических механизмов регуляции. К последним, безусловно, относится и ГЭБ как структурно-функциональная основа медленной управляющей системы организма [3, 26].

Усреднение изученных параметров по всем группам животных показывает, что состояние ЭБС сопровождается следующими изменениями биоэлектрических показателей. Преобладает симпатическая регуляция сердечного ритма, которая выражается в уменьшении моды распределения сердечных интервалов, повышении *AMo*, увеличении *ИВР*, *ВПР*, *ИН*. Наряду с этим отмечалось нарушение формы кривой распределения частоты сердечных сокращений. Она была асимметричной с преобладанием уменьшенных интервалов, что свидетельствовало о переходных процессах и выраженной тахикардии. При изучении формы кривых распределения выяснилось, что большинство из них резко отличается от нормального распределения случайных величин, характерного для контрольных животных. Автокорреляционный анализ рядов кардиоинтервалов крыс при ЭБС продемонстрировал крутой спад авто-

корреляционной функции, характеризующий слабую организацию ряда, а также преобладание автономного контура регуляции сердечного ритма. При спектральном анализе отмечается значительное уменьшение энергии волн с большим периодом, характеризующее резкую депрессию высших уровней регуляции кровообращения.

Вероятно, процессы развивались по типу эффекта Баркрофта (снижение вариабельности параметров, характеризующих состояние физиологических функций) [42]. Этому способствовало не столько выраженное повышение проницаемости ГЭБ для норадреналина и ацетилхолина (рис. 2), сколько резкое нарушение ее динамики (синфазность поступления в мозг как у взрослых, так и у старых животных).

Феномены такого рода неизбежно приводили к срыву адаптационных возможностей, стойкой гипертензии, гибели значительной части животных. Роль ГЭБ в реализации общего адаптационного синдрома отметили Л.С. Штерн [50], Г.Н. Кассиль [22] и Я.А. Росин [39, 40]. Стрессор возбуждает кору и лимбико-ретикулярную систему, что приводит к высвобождению НА, который, действуя

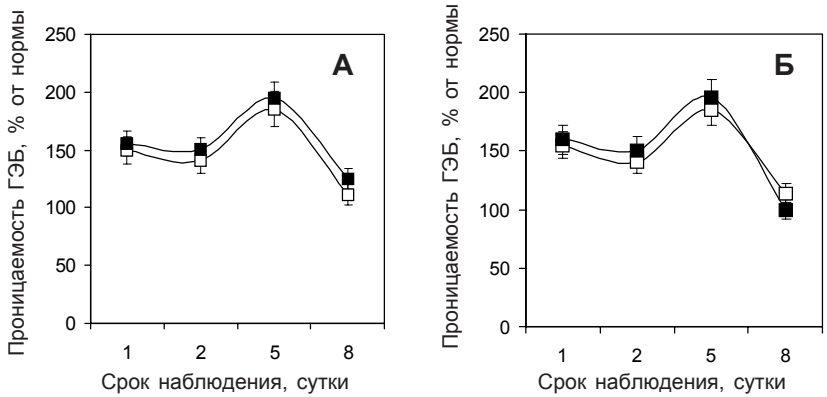


Рис. 2. Проницаемость ГЭБ крыс различного возраста после ЭБС для НА (□) и АХ (■): А – 12-месячных; Б – 24-месячных.

на адренореактивные элементы ретикулярной формации, повышает тонус симпатических центров и активизирует симпатико-адреналовую систему. Это приводит к усилению синтеза НА в мозговом слое надпочечников и увеличению его содержания в крови.

При высокой реактивности гормонального звена симпатико-адреналовой системы катехоламин (КА) проходит через ГЭБ, поступает в адренореактивные элементы заднего отдела гипоталамуса, активирует образование адренокортикотропного гормона, что приводит к выбросу в кровь кортикостероидов. Ряд веществ, связывая кортикостероиды, не позволяют им проникать через ГЭБ и нарушают обратную связь, что при стрессовых воздействиях может привести к истощению системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников.

Наши данные подтверждают большое значение ГЭБ в развитии стресса. Результаты экспериментов согласуются с концепцией о «вегетативном гуморальном рефлексе» [39,40]. Такие рефлексы включают рецепторное звено (образование метаболита медиатора); центростремительный путь (циркуляция медиатора в артериальной крови); центральный механизм (прохождение метаболита медиатора через ГЭБ); центробежный путь (может быть нервным и нейрогуморальным). При этом восстановление исходного физиологического состояния после стрессовых воздействий рассматривается как качественно новое состояние. Регуляторный процесс совершается по спирали, а не по кругу. Наши данные соответствуют научным представлениям Я.А. Росина о том, что физиологический процесс, характеризующийся повышением тонуса симпатической нервной системы через ряд регуляторных механизмов (нервных и гуморальных), сменяется противоположным состоянием – активацией парасимпатических центров [39, 40]. Можно выделить три направления нейрогуморальной регуляции вегетативных процессов: 1) взаимодействие между симпатическим и парасимпатическим отделами нервной системы; 2) обратная связь, обусловленная функцией ГЭБ (регуляция проницаемости для холиномиметиков, адреномиметиков и других биоактивных веществ, которые переключают активацию одного отдела вегетативной нервной системы на другой; 3) обратная нервная связь как функция сосудистых рефлексогенных зон и интерорецепторов [39, 40].

Характерной чертой ЭБС является крайнее напряжение регуляторных механизмов. Нейрогуморальная «спираль» прямых и обратных связей «сжимается до предела» (высокая проницаемость ГЭБ для АХ и КА практически синфазна, что может приводить к срывам нормального функционирования механизмов обратных связей). Необходимо было исследовать воздействия, способные снять напряжение, «раскрутить спираль», восстановить систему прямых и обратных связей.

Мы обратили внимание, что одним из способов «раскачки» установочных точек гомеостаза являются холодовые воздействия [26, 36]. При ритмических гипотермических воздействиях (РГВ) уровень проницаемости ГЭБ в течение нескольких минут охлаждения увеличивается в 3–4 раза, снижается до нуля, возвращается к норме и снова резко возрастает (рис. 3). Эти процессы приводят к синхронным колебаниям вегетативного статуса организма и полным симпатопарасимпатическим переключениям вплоть до смены знака кардиотропных эффектов (табл. 2). Снижение *Mo* при возрастании ΔX и *AMo*, низкие значения I_k, $m0$, и S_m свидетельствуют о значительных перестройках в механизмах симпатических и парасимпатических звеньев регуляции и некотором преобладании активности парасимпатической нервной системы. По нашему мнению, в условиях гипотермии эти изменения могут быть связаны с проникновением КА в гипотала-

Таблица 2. Статистические показатели динамического ряда кардиоинтервалов при РГВ

Mo	76,4 ± 6,1*
ΔX	110,5 ± 3,1*
AMo	135,9 ± 5,2*
ИН	120,2 ± 4,4*
ИВР	111,1 ± 3,3*
ВПР	120,2 ± 5,4*
Ik	20,1 ± 7,1*
m0	26,4 ± 6,4#
Sm	60,4 ± 6,3*

Примечания: * – различия достоверны по сравнению с контрольными значениями, принятыми за 100%, $P < 0,05$; # – $P < 0,01$.

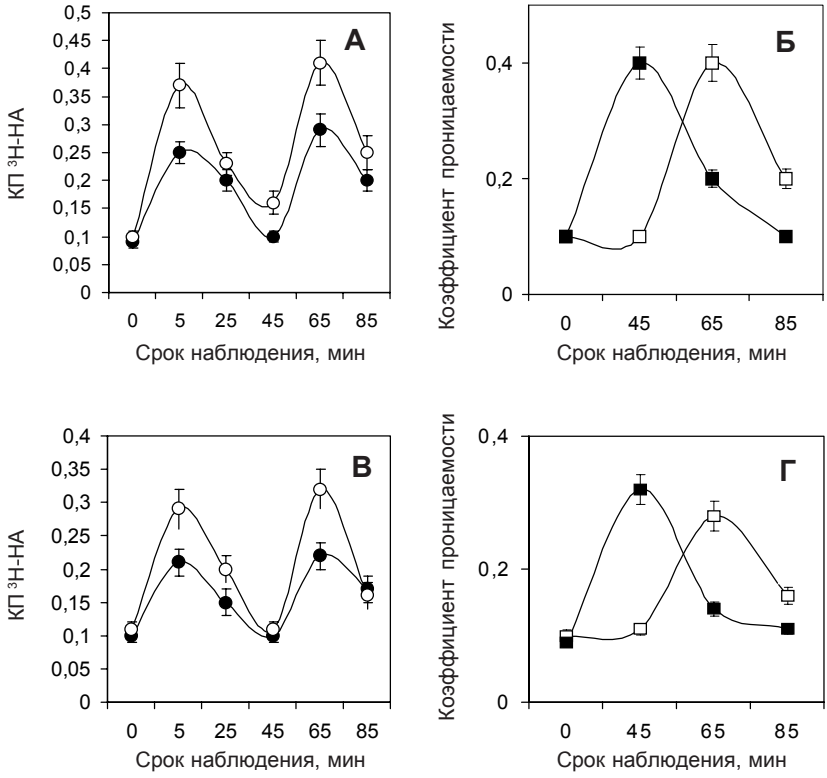


Рис. 3. Проницаемость ГЭБ крыс при РГВ с частотой 0,1 Гц: А, Б – 12-месячные; В, Г – 24-месячные животные; ● – проницаемость коры; ○ – гипоталамуса; ■ – проницаемость для АХ; □ – для НА.

мус, где он оказывает парасимпатическое влияние на центры сердечно-сосудистой системы.

Результаты исследований показали, что на 45–65-й минуте холодового воздействия при системном введении АХ и НА соответственно наблюдался центральный эффект на ЧСС, т. е. НА снизил, а АХ ускорил сердцебиение (табл. 3). При инъекции НА на фоне ритмической гипотермии ЧСС уменьшается линейно, хотя и напоминает так называемую отрицательную лестницу (феномен Вуд-

Таблица 3. Влияние РГВ на проницаемость ГЭБ и ЧСС на фоне системного введения норадреналина и ацетилхолина

Длительность воздействия, мин	ЧСС, %		КП	
	Введение НА	Введение АХ	Введение ^{3}Н-НА	введение ^{3}Н-АХ
0	115 ± 5	80 ± 5	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,03
45	110 ± 4	120 ± 6*	0,2 ± 0,05	0,45 ± 0,01*
65	60 ± 5*	80 ± 5	0,5 ± 0,04*	0,18 ± 0,05
85	105 ± 6	75 ± 5	0,19 ± 0,05	0,2 ± 0,06

Примечания: НА – норадреналина гидротартрат (0,2%-й раствор, 0,5 мл/100 г); ^{3}Н-НА – 20 мкл раствора 1 мкКи/1 мкл; КП – отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови; АХ – ацетилхолин хлористый (10 мг/100 г); ^{3}Н-АХ – 5 мкл, 1 мкКи/1 мкл; * – различия достоверны по сравнению с исходным значением (0 мин), $P < 0,01$.

вордса) [42]. В подобных условиях при введении АХ изменения ЧСС носят квазисинусоидальный характер положительной лестницы (феномен Боудичи) [42]. Такое влияние нейротрансмиттера на динамику ЧСС при РГВ должно отражать особенности проницаемости ГЭБ. Максимумы проницаемости для ^{3}Н-НА и ^{3}Н-АХ приходятся на разные этапы РГВ в полном соответствии с моментом их центральных эффектов (табл. 3). Физиологическая целесообразность повышения проницаемости ГЭБ при гипотермии заключается в необходимости поддержки усиленного функционирования доминирующих нейротрансмиттерных процессов головного мозга поступающими из крови биогенными аминами. Таким образом, парадоксальные кардиотропные эффекты при гипотермии обусловлены повышенным уровнем проницаемости ГЭБ.

Вероятность такого рода феноменов важно учитывать в практической медицине при проведении лечебной гипотермии. Интересно

было использовать специфичный эффект «мягкого стресса» ритмических режимов охлаждения для «смягчения» последствий «жесткого», например ЭБС.

Анализ результатов экспериментов по влиянию РГВ с частотой 0,1 Гц на крыс после ЭБС показал, что при системном введении НА и у этой группы животных происходило замедление ЧСС (центральный эффект). Однако наблюдалась определенная несогласованность показателей динамики ЧСС у 12- и 24-месячных крыс. Ритмическая гипотермия стимулирует (через изменение ГЭБ) вегетативную нервную систему и, прежде всего, ее главный интегратор – гипоталамус. При старении в первую очередь страдает нервное звено регуляции сердечно-сосудистой системы. Возможно, поэтому мы не выявили существенных возрастных особенностей в гуморальном звене цепи обратных связей «последнего рубежа защиты» стареющих систем регуляции. Доминирование симпатики или парасимпатики при ритмическом охлаждении происходит периодически, в противофазе, синхронно с изменением проницаемости ГЭБ для КА и АХ. Чтобы правильно подобрать ритм воздействия, важно знать время первичного ответа системы (в данном случае повышения проницаемости ГЭБ). У 12-месячных животных это 8-е воздействие при частоте 0,1 Гц, причем увеличение частоты в 2 раза сдвигает время ответа. У старых животных отмечены вариабельность первичного ответа (8-е воздействие с большой дисперсией при 0,1 Гц), отсутствие адекватного сдвига ответа при увеличении частоты воздействия до 0,2 Гц, жесткий стабильный ответ на 8-е воздействие при частоте 0,05 Гц. Охлаждение 24-месячных крыс именно в этом ритме приводило к максимальному повышению проницаемости ГЭБ (рис. 4).

Частоту воздействия 0,05 Гц следует считать наиболее эффективной для стимуляции защитных систем организма старых животных

Усиление противофазных колебаний проницаемости ГЭБ для симпато- и парасимпатомиметиков после гипотермии гипертензивных животных (после ЭБС) приводило к естественной переходной ритмике функционирования ГЭБ от охлажденного к эутермному мозгу (рис. 5) и устойчивой нормализации кровяного давления.

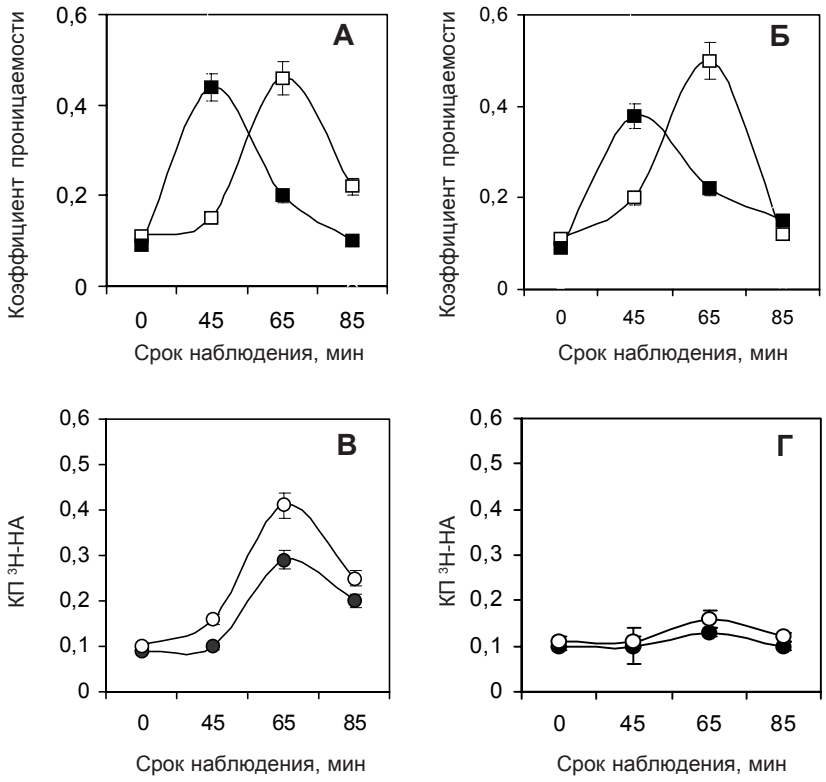


Рис. 4. Проницаемость ГЭБ при ритмической гипотермии с разной частотой воздей-ствия: А, Б – 0,05 Гц (12- и 24-месячные крысы соответственно); В, Г – 0,2 Гц (12- и 24-месячные крысы соответственно); ● – проницаемость коры; ○ – гипоталамуса; ■ – проницаемость для АХ; □ – для НА.

Таким образом, достоверно установлено, что при ЭБС в 1,5–2 раза увеличивается проницаемость ГЭБ для НА и АХ. Снижение резистентности ГЭБ для этих нейромедиаторов синфазно и одинаково в различных структурах головного мозга. Происходит неспецифическое повышение уровня проницаемости.

При ритмической гипотермии в 3–4 раза повышается проницаемость ГЭБ для НА и АХ. Динамические характеристики прони-

цаемости для АХ и НА находятся в противофазе и различны в разных структурах мозга.

Динамика проницаемости ГЭБ крыс, перенесших ЭБС, после РГВ стабилизируется, соответствует естественному усиленному гипотермией ритму. Нормализуются спектрально-корреляционные характеристики ЭКГ и ЭЭГ.

Применение гипотермической нагрузки выявляет диапазон адаптационных возможностей ГЭБ старых животных. У 12-месяч-

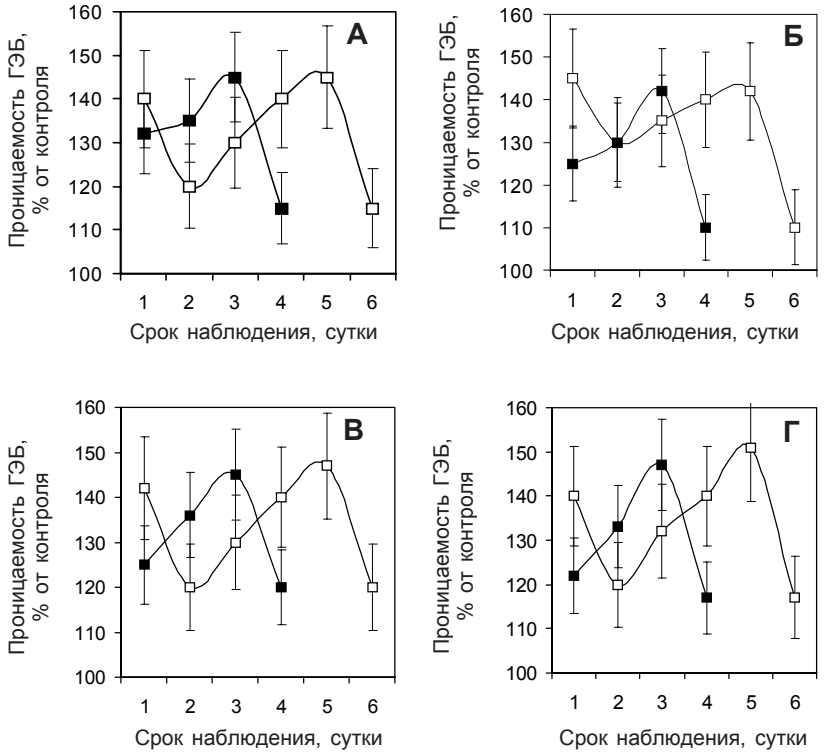


Рис. 5. Проницаемость ГЭБ после ритмической гипотермии с частотой воздействий 0,05 Гц на крыс разного возраста: А, В – 12-месячных (А - РГВ, В – ЭБС + РГВ); Б, Г – 24-месячных (Б – РГВ; Г – ЭБС + РГВ); ■ – проницаемость для АХ; □ – для НА.

ных крыс при РГВ с частотой 0,05–0,2 Гц одинаково эффективно повышает проницаемость ГЭБ, вызывая характерный паттерн биоэлектрической активности мозга с доминированием в спектре частот 0,1–0,4 Гц (феномен удвоения ритма). У 24-месячных животных для снижения как резистентности проницаемости ГЭБ, так и гипертензии, вызванной ЭБС, наиболее эффективны РГВ с частотой 0,05–0,1 Гц. У 2-годичных крыс ЦНС менее пластична, верхний диапазон воздействий в секундном ритме не отслеживается.

Мы предлагаем использовать в практической криомедицине общие положения разработанного экспериментального способа повышения проницаемости ГЭБ для лекарственных веществ. Необходимо иметь в виду, что ритмическое холодовое воздействие на организм с частотой 0,1 Гц уже в первые 10–15 мин может привести к повышению проницаемости ГЭБ, достаточному для проявления центральных (парадоксальных) эффектов системно введенных кардиотропных препаратов. В современных концепциях общего адаптационного синдрома полезно учитывать триггерные возможности нейротрансмиттерных механизмов функционирования ГЭБ, поскольку от уровня его проницаемости зависят адаптивные реакции сердечно-сосудистой и центральной нервной систем.

До настоящего времени концепция стресса строилась на общих принципах рефлекторной теории (стимул-ответ), однако приведенные данные свидетельствуют о том, что стресс проявляется как разветвленная системная реакция организма.

Именно в организации ее ритмического рисунка, по нашему мнению, принимает участие ЭЭС.

Поддержка сложной иерархии ритмов, даже в физической системе, означает наличие синхронизирующего механизма. Логично предположить, что у млекопитающих сформировалась специальная функциональная система, контролирующая и направляющая ритмику адаптационного процесса в его как специфическом, так и неспецифическом проявлении (специфическая регуляция неспецифической «раскачки» установочных точек специальных параметров гомеостаза). Наиболее физиологичным адекватным стрессором для такой системы могут быть определенные колебания

температуры, поскольку в регуляции структурно-функциональной ритмики организма особая роль принадлежит термосенситивным процессам, которые оценивают соответствие степени упорядоченности или хаоса внутренней и внешней среды организма. Видимо, не случайно совпадение рабочих частот терморецепторов и резонансной частотной полосы ГЭБ в диапазоне секундного ритма сверхмедленной биоэлектрической активности мозга, что определяет синхронизацию функционирования основных элементов ЭЭС. Такая система прогрессивно развивается в процессе эволюции и, возможно, в полной мере функционирует только у теплокровных организмов, которые вместе с гомойотермией приобрели способность перцепции энтропийных характеристик внешней среды, так как термосенситивные механизмы могли интегрироваться с термостатическими.

К проблеме специфичности холодовых воздействий разной интенсивности на структурно-функциональное состояние ГЭБ

Сравнительный анализ нейрофизиологических моделей центральной терморегуляции разной степени сложности [57, 68] показывает, что ни одна из них не имеет радикальных преимуществ. Аналогичная ситуация сложилась и в среде физико-математических моделей, описывающих механизмы общей терморегуляции [38]. Можно сделать неутешительный вывод, что в вопросе изучения физиологической системы обеспечения температурного гомеостаза естествоиспытатели подошли к некоторому пределу, за которым следует учитывать взаимное влияние множества функциональных систем организма. Объективный взгляд на проблему показывает, что нет даже предмета для дискуссии о структурно-функциональной специализации терморецепции. Отсутствуют однозначные доказательства существования специализированных морфологических образований – терморецепторов. Основная группа периферических квазиспецифических термосенсоров в организме – механохолодовые нервные окончания – имеют существенную механочувствительную составляющую. Температурно-зависимые характеристики импульсации афферентов при-

обретают «классический» для холодовых сенсоров колоколообразный вид с максимумом активности при температуре 32...33°С только при некотором уровне механического раздражения иннервируемого участка кожи [19]. Эти и другие данные позволяют говорить о выполнении функции термического восприятия биологическими датчиками разной модальности, например сосудистыми барорецепторами [20]. Анализ работ по исследованию центральных механизмов температурной рецепции позволяет сделать заключение, что в процессах поддержания гомойотермии может вообще отсутствовать «установочная температурная точка», а регулируется не температура или теплосодержание, а некий интегральный показатель. В работе В.Г. Розина [38] он назван показателем физиологического благополучия, находящимся за пределами нынешнего понимания целого организма.

На наш взгляд, в этой ситуации уместно использовать основную парадигму экзистоэнцефалической системы о регуляции и поддержании оптимального уровня структурно-функциональной геометрии мозга, интегральным показателем которой является фрактальная размерность [35], для определения степени специфичности действия стрессоров различной интенсивности, но одной (температурной) модальности.

Было проведено специальное исследование общего уровня лабильности функциональной архитектоники ЭЭС по показателям фрактальной размерности с целью определения морфометрических коррелятов состояния ГЭБ при периодическом действии низких положительных и экстремально низких отрицательных температур.

Ритмические экстремальные холодовые воздействия (РЭХВ) осуществляли в криокамере с температурой воздушной среды –120°С в течение 1–2 мин: 3РЭХВ – 3 последовательных сеанса охлаждения с перерывом 10 мин; 6РЭХВ – 2 сеанса 3РЭХВ через двое суток; 9РЭХВ – 3 сеанса 3РЭХВ через двое и трое суток. В результате использования такого протокола РЭХВ достоверно не изменялась ректальная температура животных.

Ритмические гипотермические воздействия (РГВ) проводили на промышленном гипотермогенераторе, из которого поступал холодный воздух (8...12°С) в индивидуальные пластиковые камеры с животными на протяжении 120 мин (6 односекундных холодовых

стимулов в 1 мин). Выбранный режим РГВ вызывал колебания температуры тела у ненаркотизированных крыс в пределах 1°С, приводя к снижению температуры ротовой полости на 1,2±0,6°С.

При морфометрической обработке данных использовали разработанную нами компьютерную систему анализа FRAM [27, 29]. Для фрактального анализа в среду FRAM переносили фрагменты цифровых изображений полутонких и ультратонких срезов ткани мозга. Реализуя известный математический аппарат [64, 65], рассчитывали фрактальные размерности (D). Для этого методом «перекрывающихся окон» сканировали выбранный участок среза. В каждом окне рассчитывали фрактальную размерность (D) как тангенс угла наклона графика линейной аппроксимации логарифмической зависимости площади поверхности перепадов яркости изображений от стороны квадрата, который ее ограничивает. При интерпретации данных учитывались положения теории обобщенного броуновского движения, в которой фигурирует величина H, связанная в нашем случае с D простым соотношением: $H = 2 - D$ [65]. Считается, что при $H = 1$ система линейна и детерминирована, $H = 0{,}5$ – случайна, $1 > H > 0{,}5$ – персистентна (самоподдерживающаяся, стабильная, положительно коррелированная), $0 < H < 0{,}5$ – антиперсистентна (отрицательно коррелированная, имеет тенденцию к перестройкам).

Расчёт размерности препаратов показал, что в широком масштабе величин (×120–12000) общая архитектоника изученных структур мозга контрольных животных, особенно вблизи капилляров, имеет выраженные фрактальные свойства. Примечательно, что хаотичность структуры ультратонких срезов несколько выше полутонких, что, однако, может быть связано не только с особенностями ультраструктурной организации, но и со спецификой метода фрактального анализа (повышением разрешающей способности при детализации объекта).

По D-критерию как в условиях РГВ, так и при РЭХВ происходит существенная перестройка глубинных процессов в тонких механизмах нейро-глиально-эндотелиальных взаимоотношений при сохранении общей архитектоники мозговой ткани. Динамика фрактальной размерности при РГВ свидетельствует о повышении пластичности, но и сохранении устойчивости структурных компо-

нентов. Так, периоды антиперсистентности (отрицательной корреляции взаиморасположения микрочастиц биообъекта, ведущей к их перегруппировке) на 40-й и 80-й минуте РГВ лежат между периодами персистентности (положительной корреляции расположения микрочастиц биообъекта, ведущей к повышению лабильности, «упругости» их топологии при стабилизации состояния) на 10-й, 60-й , 120-й минуте РГВ (рис. 6, А). Такая динамика изменения фрактальной размерности при РГВ может свидетельствовать об общей устойчивости функциональной геометрии изученных структур при существенном повышении пластичности триады: нейрон-глия-капилляр. Необходимо отметить, что изменения ультраструктуры более выражены в переднем отделе гипоталамуса (ПГТ) по сравнению с задним отделом гипоталамуса (ЗГТ). В сенсомоторной области коры (СМК) не выявлено достоверных отличий от контрольных значений.

При РЭХВ также происходят кардинальные перестройки интимных ультраструктурных взаимодействий (рис. 6, Б). Динамика *D* менее ритмична по сравнению с РГВ, без резких перепадов

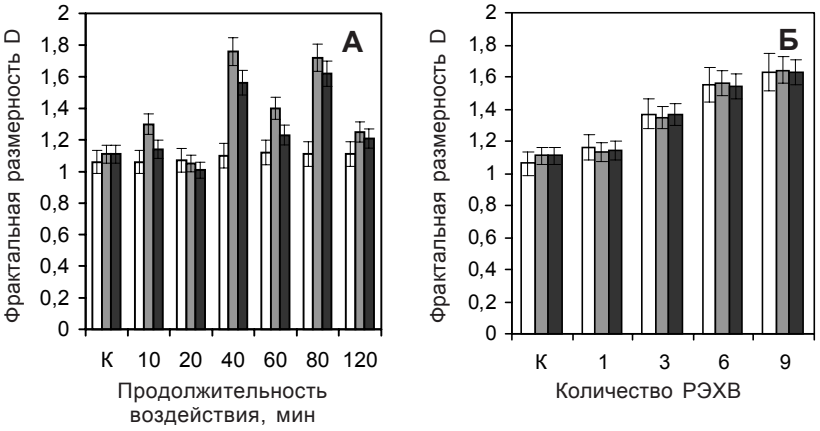


Рис. 6. Фрактальная размерность *D* структур мозга в динамике ритмических холодовых воздействий: А – РГВ; Б – РЭХВ; □ – СМК; ▨ – ПГТ; ■ – ЗГТ; К – контроль (интактные животные).

(нет точки перехода в область линейных отношений эвклидовой геометрии, как на 20-й минуте РГВ) и менее устойчива (*D* находится в опасной близости к зоне несогласованных, случайных изменений). Повышенная фрактализация элементов ультраструктуры сохраняется после 9РЭХВ, охватывая весь гипоталамус и сенсомоторную область коры головного мозга. По *D*-критерию элементы ультраструктуры после РЭХВ находятся в состоянии повышенной готовности к трансформациям (значения *D* не возвращаются к норме и остаются в антиперсистентной зоне).

Наиболее существенные изменения отмечены нами в ультраструктуре эндотелиоцитов и окружающей сосуд базальной мембране.

На 10-й минуте РГВ происходит некоторое уменьшение толщины базальной мембраны, на 60-й минуте этот показатель увеличивается и к 120-й минуте – на 30–40% превышает контрольные значения. Важно отметить, что в капиллярах ПГТ толщина базальной мембраны увеличивается несколько больше, чем в капиллярах ЗГТ. Аналогичные изменения претерпевают линейные параметры базальной мембраны мозговых капилляров после РЭХВ. Специфика действия РГВ и РЭХВ выявляется при фрактальном анализе. По критерию фрактальной размерности после 3РЭХВ базальная мембрана становится более жесткой ($D < 1{,}1$), после 6РЭХВ она приближается со стороны персистентности к зоне «броуновского движения» (D порядка 1,45) и после 9РЭХВ переходит в антиперсистентную область (D порядка 1,55; рис. 7, Б). Тогда как при РГВ обнаруживается иная, в большей части противоположная динамика: от антиперсистентной геометрии к персистентной и эвклидовой (рис. 7, А).

Гель базальной мембраны, образованный глюкозаминогликанами, создает молекулярный и электростатический фильтр, обеспечивающий селективную проницаемость мембраны для отрицательно заряженных молекул. Кроме того, её протеогликаны обладают осмотической активностью, которая также регулирует проницаемость. Все это позволяет рассматривать базальную мембрану в качестве дополнительного регулятора функциональной активности ГЭБ [12]. Вариации площади базальной мембраны, по нашему

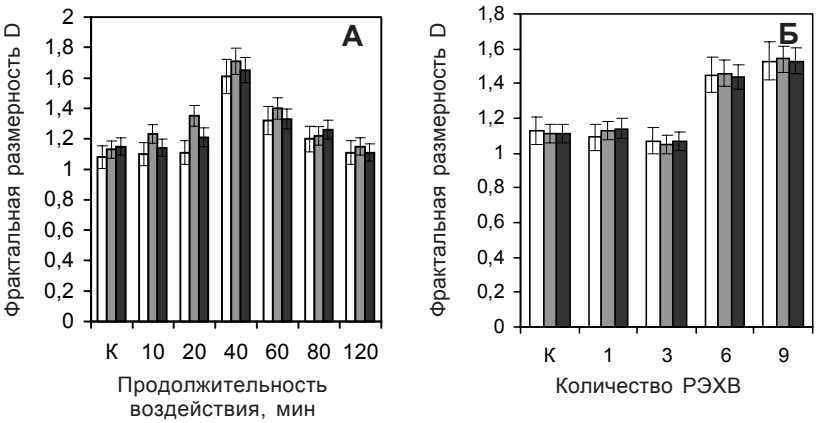


Рис. 7. Фрактальная размерность базальной мембраны в динамике ритмических холодовых воздействий: А – РГВ; Б – РЭХВ; □ – СМК; ▨ – ПГТ; ■ – ЗГТ; К – контроль (интактные животные).

мнению, могут отражать изменение степени полимеризации глюкозаминогликанов и влиять на уровень проницаемости ГЭБ.

Можно предположить, что высокий уровень фрактализации (D~1,6) отражает состояние пониженной адгезии эндотелиальных клеток к базальной мембране. В этом состоянии, возможно, разрушаются жесткие молекулярные структуры базального слоя, например рвутся дисульфидные связи в жесткой крестообразной конструкции ламинина, которая выявляется электронно-микроскопически. В наших экспериментах на некоторых препаратах мы наблюдали отслоение базальной мембраны, проникновение из ее дубликатуры отростков перицитов с образованием контактов синапсоподобной формы с эндотелиоцитами капилляров (рис. 8, А). По нашему мнению, эти ультраструктурные особенности способствуют повышению селективной проницаемости ГЭБ в направлении «мозг-кровь», их можно трактовать с позиций теории перколяции [52] и недавно открытого явления энтоза [19]. Персистентный уровень фрактализации (D~1,3) сопровождается образованием многочисленных полидубликатур базального слоя, направленных к отросткам астроцитов, реактивным состоянием органелл перици-

тов, в частности комплекса Гольджи (рис. 8, Б), что весьма характерно для секреторного состояния. В этих условиях повышается проницаемость ГЭБ для норадреналина в направлении «кровь-мозг» (рис. 8, В). Отмеченные закономерности определяют существенные структурно-функциональные особенности механизмов

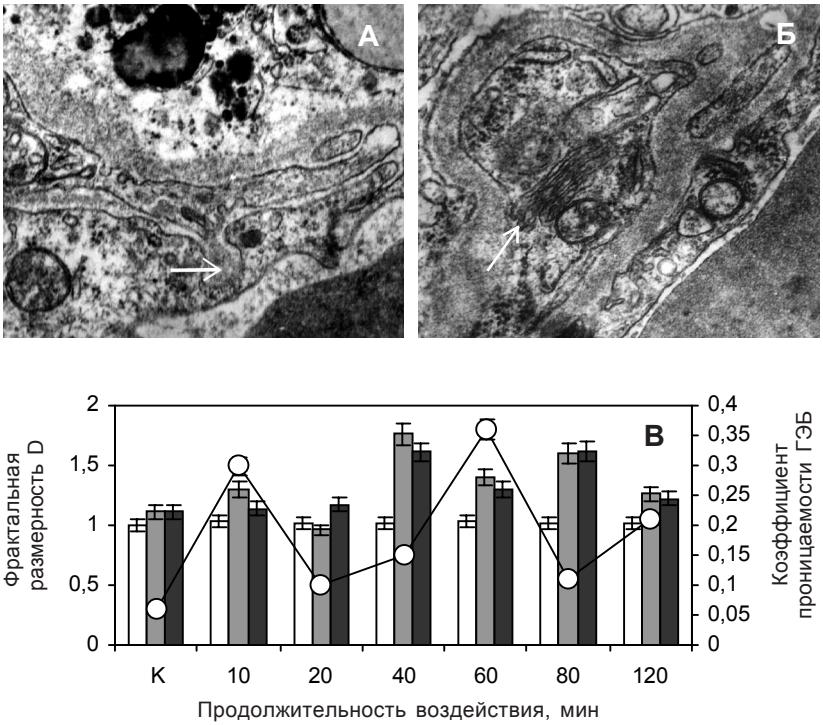


Рис. 8. Параметры структурно-функционального состояния ультраструктурных компонентов ГЭБ при ритмических холодовых воздействиях: А – электронограмма фрагмента эндотелиоцита после 6РЭХВ (стрелка указывает на отросток перицита), ×30000; Б – электронограмма фрагмента капилляра ПГТ на 65-й минуте РГВ (стрелка указывает на комплекс Гольджи), ×30000; В – фрактальная размерность эндоцитозных компартментов эндотелиоцитов капилляров головного мозга крыс (левая шкала; □ – СМК; ▨ – ПГТ; ■ – ЗГТ) и проницаемость ГЭБ ПГТ для ^{3}Н-норадреналина в динамике РГВ (правая шкала; ——); К – контроль (интактные животные).

действия изучаемых способов ритмических холодовых воздействий. Противоположные эффекты РГВ и РЭХВ могут быть общей основой для разработки новых режимов, сочетанных схем разных способов лечебной гипотермии.

На люминальном контуре эндотелиоцитов появляются и остаются после охлаждения многочисленные впячивания, увеличивается количество микровиллей. В результате этого относительная длина люминальной мембраны на срезах капилляров значительно увеличивается, что приводит к соответствующему изменению фрактальной размерности (рис. 9) и может свидетельствовать о повышении функциональной активности ГЭБ.

По нашему мнению, наблюдаемые изменения поверхности эндотелиоцитов вместе с увеличением количества эндоцитозных везикул свидетельствуют о развитии процессов пиноцитоза в эндотелиоцитах капилляров. На электронных микрофотографиях мы наблюдали все этапы формирования пиноцитозных везикул, начиная с инвагинации люминальной мембраны и заканчивая прикреплением везикул к аблюминальной мембране с последующей рециклизацией (рис. 10).

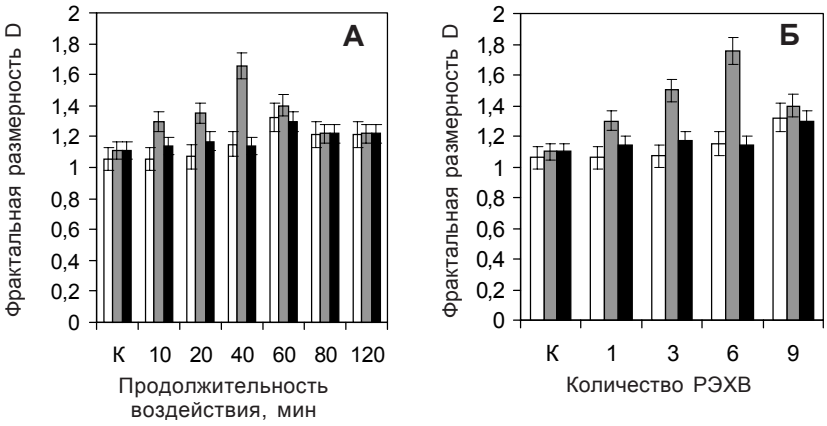


Рис. 9. Фрактальная размерность перилюминальной области эндотелиоцитов мембраны в динамике ритмических холодовых воздействий: А – РГВ; Б – РЭХВ; □ – СМК; ▒ – ПГТ; ■ – ЗГТ; К – контроль (интактные животные).

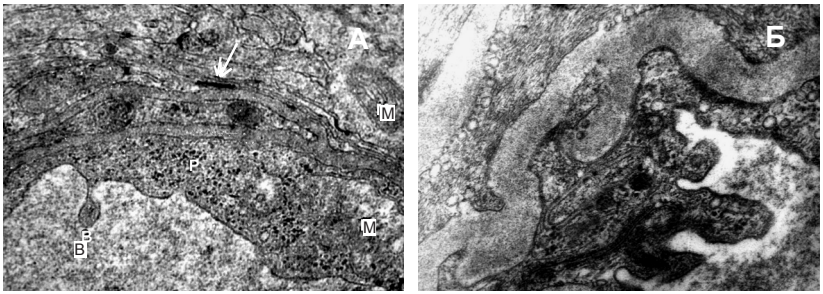


Рис. 10. Фрагменты эндотелиоцитов мозговых капилляров крыс при холодовых воздействиях: А – после 65-минутного РГВ; Б – после 6РЭХВ. Выраженная пиноцитозная активность, стрелка указывает на гистохимический маркер пиноцитоза (пероксидаза хрена), В – микровилля, М – митохондрии, ×30000.

Описанные изменения ультраструктуры элементов ГЭБ должны приводить к повышению проницаемости ГЭБ, причем отмеченные особенности структурных перестроек в изученных отделах мозга могут соответствовать разной направленности и различным уровням проницаемости ГЭБ. На разных этапах ритмического охлаждения организма происходят быстрые адаптационные преобразования, в том числе и на субклеточном уровне в эндотелии капилляров (везикулизация, трансцитоз, активация базального слоя, разветвление и увеличение обменной поверхности мембран капилляров). Ритмическая холодовая стимуляция аппарата термоперцепции приводит к периодическому изменению структурно-функциональной активности ГЭБ, оптимизации содержания разнообразных биоактивных мессенджеров, действие которых интегрируется на уровне цитолеммы и рецепторно-цитоскелетного комплекса эндотелиоцитов [69], синхронизации фрактальной организации ультраструктуры и проницаемости, что способствует повышению адаптационных возможностей функциональных систем.

Таким образом, периодические холодовые воздействия низкой положительной и сверхнизкой отрицательной температурой имеют структурно-функциональные особенности реагирования элементов ГЭБ, которые достоверно выявляются по показателям фрактальной размерности *D* функциональной геометрии структур голов-

ного мозга. Отличие *D* от единицы свидетельствует о некотором уровне хаотичности структурно-функциональной организации ГЭБ. Наиболее лабильный в этом смысле передний отдел гипоталамуса при РЭХВ (*D*~1,6), а наименее лабильна – сенсомоторная кора в условиях РГВ (*D*~1,1). Ритмические гипотермические и экстремальные криовоздействия приводят к подобным локальным структурным изменениям ткани мозга. Однако, если при РЭХВ фрактальная размерность всех изученных структур изменяется синхронно и часто составляет 1,5 (структура переходит в зону несогласованных изменений), то при РГВ изменяется в основном фрактальная размерность ПГТ, но и она остается в персистентной области (*D*~1,3), т. е. повышается структурная лабильность, но сохраняется общая организация эндотелия капилляров мозга. При персистентном уровне фрактализации ультраструктуры элементов ГЭБ в условиях действия на организм ритмических режимов охлаждения наблюдается увеличение (в 2–3 раза) проницаемости ГЭБ для норадреналина, причём если *D*~1,3, то вектор проницаемости направлен к мозгу, что характерно для РГВ. При РЭХВ возможно повышение проницаемости ГЭБ в направлении «мозг-кровь».

Нейромедиаторная система экзистоэнцефалической функции ГЭБ охлаждённого мозга

Изложенные представления об ЭЭС, организующей биоритмику холодового стресса, могут иметь значение только в том случае, если существует реальный нейрофизиологический процесс реализации такого рода функции и идентифицирована его нейромедиаторная система. Считая ГЭБ и МУС структурно-функциональной основой ЭЭС, можно предположить, что таким механизмом обеспечения физиологической картины биоколебаний холодового стресса является активация ГЭБ. При повышении проницаемости барьера для пара- и симпатомиметиков должен синхронизироваться динамический рисунок вегетативных переключений с паттерном биотоков, что приведет к изменению общего уровня активности организма, то есть реализуется основная функция ЭЭС. Тогда неизбежно возникает вопрос о «синхромессенджерах».

Установлено, что свободнорадикальный «газ» (монооксиды азота и углерода) является важным посредником физиологических процессов [5, 6, 25, 37, 58, 62, 66, 67, 72]. В сердечно-сосудистой системе NO и CO включаются в механизмы расслабления кровеносных сосудов [25, 46], а в мозге они обеспечивают нейротрансмиттерные процессы типа долговременной потенциации [74], что может играть определенную роль в центральной терморегуляции. Учитывая немаловажное значение ГЭБ в механизмах температурного гомеостаза [70, 73], следует ожидать, что NO и CO как факторы нейрональной пластичности опосредуют и терморегуляторные функции ГЭБ путем изменения его проницаемости к термокомпетентным нейромедиаторам. Другими словами, для «новой» функциональной системы регуляции общего уровня активности организма есть «новый» класс нейромедиаторов. В последнее время появились работы, подтверждающие это предположение и хорошо согласующиеся с результатами наших исследований. Так, показано, что NO играет существенную роль в центральных механизмах терморегуляции [5, 6, 66], наряду с другими факторами регулирует проницаемость ГЭБ [66, 67, 72]. Появились первые работы и о роли CO в организации такого рода процессов [62, 66, 74]. В настоящее время интенсивно разрабатываются различные методы прямого измерения содержания монооксидов азота и углерода в динамике экспериментальных воздействий, однако, по нашему мнению, их применение требует определённой осторожности, так как пока эти методики недостаточно стандартизированы. Поэтому в своей работе для изучения роли NO и CO в регуляции проницаемости ГЭБ мы применили нейрофизиологическую стратегию, используя следующие чётко установленные данные нейрохимии этих монооксидов. Оксид азота (II) синтезируется из L-аргинина при участии фермента NO-синтазы (NOS) путем присоединения молекулярного кислорода к концевому атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина при двустадийной реакции ферментативного окисления с образованием в качестве промежуточного продукта L-гидроксиаргинина. Реакция гидроксилирования ускоряется кофактором тетрагидробиоптерином, является Ca^{2+}-кальмодулин-зависимой и блокируется монооксидом углерода. На следующей стадии реакции стехиомет-

рически образуются L-цитруллин и NO в свободнорадикальной форме. NOS существует в нескольких изоформах: конститутивная cNOS и индуцибельная iNOS, последняя близка по структуре к цитохрому P450 и имеет места связывания для флавин-аденин-нуклеотидов. Оба изофермента представляют собой флавопротеины и используют NADPH в качестве кофактора [25, 46]. Индуцибельная NOS является Ca^{2+}-кальмодулин-независимой и регулируется на генетическом уровне глюкокортикоидами, интерлейкином-4, β-трансформирующим и тромбоцитарным факторами роста, активируется бактериальными липополисахаридами, эндотоксинами, интерлейкином-1, интерферонами β и γ, фактором некроза опухоли α. Она вызывает образование и длительное выделение больших количеств NO активированными макрофагами, нейтрофилами, сосудистым эндотелием, микроглиальными клетками, астроцитами [37]. В нервных клетках содержится только cNOS, которая является Ca^{2+}-кальмодулин-зависимой и в физиологических условиях в ответ на рецепторную стимуляцию катализирует образование NO в небольших количествах. Оксид азота (II) – короткоживущая молекула (5–50 с), которая, выполняя регуляторную функцию, соединяется с Fe^{2+} гема, активирует растворимую гуанилатциклазу [37, 46]. Другим активатором растворимой гуанилатциклазы является CO [25]. Хотя в отношении цГМФ эта молекула в 30 раз менее эффективна, сам монооксид углерода более стабилен. Гем-оксигеназа, которая превращает гем в биливердин и CO, как и NOS, существует в двух основных формах (изоферментах). Гем-оксигеназа-1 (HO-1), индуцируемая гемом и образующаяся путем экспрессии соответствующего гена мРНК в селезенке и печени, в которых HO-1 вызывает деструкцию гема эритроцитарной природы. Конститутивная гем-оксигеназа-2 (HO-2) широко распространена в организме, однако наибольшие её концентрации обнаружены в головном мозге: гранулярных клетках и клетках Пуркинье мозжечка, гиппокампе (особенно в его пирамидальных клетках), обонятельной луковице, коре больших полушарий и некоторых других областях мозга [62]. Обладая быстрой межклеточной диффузией, центральной и периферической системами синтеза, NO и CO потенциально являются идеальными трансмиттерами межсистемных связей.

Нами показано, что при РГВ монооксиды азота и углерода опосредуют повышение проницаемости ГЭБ особенно для ^{3}H-НА и ^{3}H-АХ. Как свидетельствуют модельные нейрофизиологические опыты, существуют оптимальные для повышения проницаемости ГЭБ концентрации NO и CO (рис. 11). На одних этапах гипотермического воздействия проницаемость ГЭБ не достигает своего максимального уровня из-за того, что оксид азота находится еще не в оптимальной концентрации, так как стимуляция синтеза NO внутрибрюшинным введением L-аргинина (1–2 мг/100 г) увеличивает проницаемость ГЭБ до уровня второго максимума проницаемости, а блокада α- и β-адренорецепторов фентоламином и пропранололом (1 мг/100 г) или Na^+-K^+-АТФазы оубаином (1 мг/100 г) снижает проницаемость ГЭБ до уровня контроля. На следующих этапах гипотермического воздействия концентрация

Рис. 11. Проницаемость ГЭБ при ритмической гипотермии на фоне фармакологических воздействий: 1, 5, 11 - ^{3}H-АХ; 2–4 – ^{3}H-НА при блокаде кальциевых каналов; 6, 14 – ^{3}H-НА при инъекции в мозг CO на фоне блокады адренорецепторов; 7, 15 – ^{3}H-НА при блокаде адренорецепторов; 8, 13 – ^{3}H-АХ при инъекции в мозг CO на фоне блокады адренорецепторов; 9, 10 – ^{3}H-АХ при блокаде адренорецепторов; 12, 18 – ^{3}H-АХ при активации синтеза CO; 16 – ^{3}H-НА при активации синтеза NO; 17 – ^{3}H-НА при активации синтеза CO; С – коэффициент проницаемости для ^{3}H-НА;

NO, очевидно, находится на почти оптимальном для состояния повышенной проницаемости ГЭБ уровне, так как экспериментальное повышение и понижение содержания NO уменьшает проницаемость ГЭБ. Однако более мягкое воздействие на синтез NO внутрибрюшинным введением аспарагина (1 мг/100 г), увеличивающего концентрацию оксида азота опосредованно через аргининсукцинат, приводит к максимальному увеличению проницаемости ГЭБ.

На минимумах проницаемости ГЭБ содержание NO возможно превышает оптимальный для обеспечения состояния повышенной проницаемости уровень, так как стимуляция синтеза NO аргинином влияет на дальнейшее снижение проницаемости, а опосредованное подавление синтеза оксида азота, наоборот, – увеличивает проницаемость барьера.

Можно предложить следующую гипотетическую схему последовательности нейрофизиологических событий, приводящих к повышению проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейромедиаторов (рис. 12).

Начальный этап ритмической гипотермии характеризуется комплексом условий (увеличение функциональной активности биогенных аминов и активирующих аминокислот, инициирующих процессы долговременной потенциации), которые приводят к каскадному включению разных изоформ NOS, что сопровождается повышением содержания циклических мононуклеозидов, при этом активируются соответствующие протеинкиназы, регулирующие процессы фосфорилирования цитозольных и цитоскелетных белков, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ [26-30]. Очевидно, на начальных этапах РГВ активно включается в работу конститутивная NOS васкулярных эндотелиоцитов для «аварийной» компенсации напряжения симпатики периферии парасимпатикой мозга. Этот процесс контролируется компенсаторными механизмами ЦНС. В лимбических структурах мозга усиливается долговременная потенциация, активируется нейрональная cNOS, которая поддерживает оптимальный уровень NO (пмоль). При дальнейшем охлаждении возникают характерные структурные изменения эндотелиоцитов и их нейроглиального окружения [26], что приводит к усилению фагоцитарной активности, например перицитов,

а значит и к активации индуцибельной Ca^{2+}-независимой NO-синтазы. Резко (в 1000 раз) возрастает наработка NO, «затапливая» рецепторные поля нейротрансмиттерных механизмов открытия ГЭБ, происходит экстренное восстановление его резистентности.

Вследствие такой компенсации повышается вероятность локальных гипоксических явлений в компартментах эндотелиоцитов капилляров и нейроглиальных комплексов. Известно, что гипоксия приводит к существенному повышению активности гемоксигеназ, которые считают белками теплового шока. При взаимодействии гемоксигеназы с цитохром-Р450-редуктазой происходит

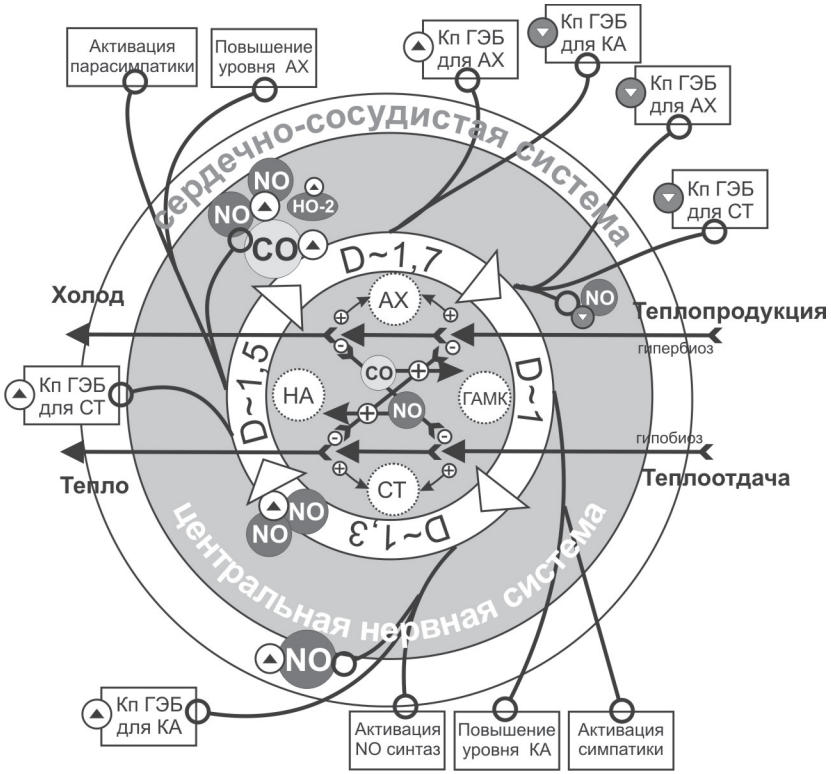


Рис. 12. Схема ГЭБ-зависимых центральных механизмов терморегуляции при гипотермии и гибернации.

образование СО [25]. Монооксид углерода вызывает диссоциацию адренорецепторов с лигандами, но не затрагивает ацетил-холиновые рецепторы. Эти процессы переключают механизмы проницаемости ГЭБ для НА на избирательную проницаемость для АХ. Дальнейшее охлаждение должно способствовать спаду активности цитохромов-Р450 и цГМФ при нарастании концентрации цАМФ, при этом проницаемость ГЭБ для АХ несколько снижается, а для НА снова возрастает, так как СО тормозит синтез оксида азота, возвращая оптимальную для функционирования ГЭБ концентрацию NO. Следовательно, если NO является триггером проницаемости ГЭБ для биогенных аминов, то СО – своеобразным переключателем симпато-парасимпатических потоков. Повышение проницаемости ГЭБ для ^{3}Н-НА и ^{3}Н-АХ стимулирует адаптивные термоспецифические процессы в мозге, оптимизируя центральные механизмы температурного гомеостаза.

Таким образом, NO и СО могут быть нейрональными посредниками медленной управляющей системы мозга, включающимися в процессы регулирования при экстремальных или систематически действующих раздражителях; ее структурно-функциональной основой является ГЭБ. В таких условиях, по нашему мнению, СО осуществляет связь ГЭБ с монооксигеназной системой, а NO – с иммунной, объединяя три защитные системы в одну, которую можно условно назвать экзистоэнцефалической. Интеграция регулирующих систем, участвующих в поддержании гомеостаза, интенсивно изучается во всем мире и рассматривается как наиболее перспективная область современных исследований [1]. В настоящее время имеется обширная информация, проливающая свет на формирование новой интегративной области биологии – нейроиммуноэндокринологии [1]. При этом особое внимание уделяется анализу многостороннего обмена сигналами в пределах взаимодействующих систем и изучению закономерностей, лежащих в основе интеграции каждого регуляторного звена в единый управляющий «ансамбль». Именно в этом аспекте целесообразно рассматривать полученные данные, которые свидетельствуют о существовании единой защитной системы мозга, не сводящейся только к гематоэнцефалическому барьеру или иммунооксигеназным процессам в отдельности. Защитная функция ЭЭС – важная,

но не единственная, её взаимодействие с терморегуляторными процессами определяет наиболее интригующую «криобиологическую» роль.

ЭЭС в центральных механизмах терморегуляции. Механизмы избирательной проницаемости ГЭБ

«Запустить» ЭЭС можно практически любым стрессором, однако температурные факторы можно считать более физиологичными и, вероятно, они используются в природных условиях. Криобиологические аспекты изучения ЭЭС конкретизируют хорошо аргументированную гипотезу о «раскачке» установочной точки гомеостаза как нервно-гормонального механизма периодического расширения его температурных границ. Предполагается, что феномен «раскачки» характерен для всей сезонной динамики разных форм торпора млекопитающих и птиц, а также для процесса природной адаптации северных эутермных животных [36]. Однако такая точка зрения предполагает ответ на принципиальный вопрос: каким образом функциональное состояние ГЭБ, непроницаемого для большинства термокомпетентных нейромедиаторов, может направленно влиять на специфические нейротрансмиттерные процессы терморегуляции? Так, центральные механизмы обеспечения теплопродукции организма во многом опосредуются моноаминами и АХ [57, 68], которые в физиологических условиях обычно не проникают через ГЭБ [4–12], а значит вряд ли имеют систему специфических переносчиков. В некоторых условиях ГЭБ все же может включаться в терморегуляторные нейрофизиологические механизмы, поэтому мы попытались понять, как может быть обеспечена избирательность проницаемости при относительной неспецифической активации ГЭБ охлаждённого мозга.

На начальном этапе охлаждения повышается активность норадренергических синапсов, которые усиливают доминирующий нейротрансмиттерный процесс терморегуляторных механизмов. В этот момент целесообразна поддержка центральных нейротрансмиттерных систем норадреналином из крови в качестве локального нейрогормона, что обеспечивается повышением проницаемости ГЭБ для НА уже на 5-й минуте воздействия. Продление гипотермического воздействия приводит к активации АХ нейронов,

инициирующих увеличение теплопродукции. Этому процессу способствует высокая проницаемость ГЭБ для АХ. Вероятно, функциональное состояние ГЭБ может влиять на ацетилхолинергические и норадреналинергические механизмы обеспечения теплопродукции, причем посредством достаточно хорошо изученных биохимических реакций. Увеличение при РГВ секреции нейротрансмиттеров должно приводить к активации системы вторичных и ретроградных мессенжеров. При этом, очевидно, активируются соответствующие протеинкиназы, регулирующие процессы фосфорилирования цитозольных и цитоскелетных белков, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ.

В первые минуты РГВ существенно возрастает секреция НА, увеличиваются содержание цАМФ и аккумуляция Ca^{2+}, начинается разборка микротрубочек цитоскелета, относительная длина которых к 20-й минуте воздействия снижается в 3 раза. Процесс может осуществляться за счет цАМФ-зависимого фосфорилирования высокомолекулярных белков (типа MAP2 [54]), ассоциированных с микротрубочками, а также тубулина [17, 18, 48]. Данный этап РГВ характеризуется первым максимумом проницаемости для 3Н-НА. Дальнейшее охлаждение приводит к увеличению активности ацетилхолинергических процессов, при этом стимулируется накопление цГМФ, опосредующее полимеризацию тубулина микротрубочек [17,18,48], относительная длина которых увеличивается почти на порядок. На этом этапе воздействия отмечается максимум проницаемости ГЭБ для АХ. Далее, когда содержание цГМФ начинает снижаться, а цАМФ продолжает повышаться, уменьшается длина микротрубочек, развивается второй максимум проницаемости для ^{3}Н-НА и т.д. Можно предположить, что повышение проницаемости ГЭБ для НА каким-то образом связано с деполимеризацией тубулина, а увеличение проницаемости барьера для АХ – со сборкой микротрубочек.

В следующей серии экспериментов мы попытались выяснить конкретные механизмы, обеспечивающие относительную избирательность проницаемости ГЭБ для АХ и НА при гипотермических воздействиях. Показано, что повышение проницаемости ГЭБ при РГВ для НА обеспечивается высокоспецифическим рецептор-индуцированным трансцитозом. Важным этапом и свое-

образным маркером этого процесса является образование так называемых «одетых» или клатриновых везикул [17, 18], содержание которых при РГВ существенно увеличивается. Детальный анализ электронограмм исследованных образцов гипоталамуса показал неоднородность популяции этих везикул, которые в одной и той же эндотелиальной клетке существенно отличались размерами (от 50 до 250 нм) и электронной плотностью. К 50-й минуте воздействия при максимальной проницаемости ГЭБ для АХ увеличивается количество более крупных и менее электронноплотных клатриновых везикул, а на 65-й минуте РГВ отмечается появление более мелких осмиофильных «одетых» пузырьков .

Процессы везикулярного транспорта в общих чертах универсальны для разных клеточных систем [17, 18]. Можно предположить, что осмиофильные клатриновые везикулы могут быть переносчиками НА, а осмиофобные – АХ. Аналогично тому, как синапсы С-типа с электронноплотными везикулами считаются моноаминергическими, а S-типа со светлыми синаптическими пузырьками – ацетилхолинергическими. Если это так, тогда разница в величине транспортных везикул могла бы способствовать избирательной проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейромедиаторов.

На сегодня механохимическая концепция везикулярного транспорта [17, 18] наиболее разработана и представляется нам перспективной для решения обсуждаемой проблемы. Транспорт «одетых» везикул осуществляется по нитям цитоскелета к району экзоцитоза. Поэтому вначале интересно было определить место конечного этапа трансцитоза АХ и НА. Увеличение эндоцитоза при РГВ приводит к естественному уменьшению относительной длины люминальной мембраны, однако при этом длина аблюминального контура существенно не увеличивается, в то время как латеральная мебрана эндотелиоцитов, образующая плотные контакты, удлиняется в 1,5–2 раза. Трансцитоз везикул предполагает сочетание эндо- и экзоцитоза. При эндоцитозе до завершения рециклизации должно происходить уменьшение, а при экзоцитозе – увеличение мембраны эндотелиоцита. В нашем случае при неизменной длине аблюминального контура трансцитоз может осуществляться, например, за счет временных трансэндотелиальных каналов или

постоянного водного пространства в области плотных контактов, на стороне которых увеличивается длина мембраны. По нашему мнению, эти два возможных пути определяют селективную проницаемость ГЭБ для АХ и НА. Высказанное предположение косвенно подтверждается центральными эффектами АХ и НА при системном введении нейромедиаторов. Такое влияние нейротрансмиттеров на динамику изменения ЧСС при РГВ должно в известной степени отражать особенности проницаемости ГЭБ. При введении НА на фоне РГВ ЧСС снижается линейно и сохраняется на пониженном уровне 5–10 мин. В подобных условиях при введении АХ изменение ЧСС имеет синусоидальный характер: периоды повышения ритмики сменяются периодами снижения ЧСС с частотой 0,1–0,5 Гц.

Можно предположить, что процессы повышения проницаемости ГЭБ для НА и АХ разнесены в пространстве и времени. Если проницаемость ГЭБ для НА на основе его центральных эффектов на ЧСС объясняется наличием системы относительно постоянно существующих каналов, то динамика ЧСС при системном введении АХ, напротив, свидетельствует о том, что проницаемость ГЭБ для АХ могла быть обеспечена «временными» каналами, пропускающими АХ с секундной ритмикой.

Учитывая собственные и литературные данные относительно роли цитоскелетной сети в избирательном транспорте, следует обратить внимание на важное, хотя не бесспорное положение о том, что активная роль в генерации движения принадлежит системе актин-миозин, тогда как пассивная – микротрубочкам, по которым, как по «рельсам», передвигаются везикулы и органеллы [17, 18]. По нашему мнению, определяющим избирательность трансцитоза элементом цитоскелета являются микротрубочки, хотя в эндотелиоцитах они выявляются намного реже, чем другие элементы, особенно в условиях гипотермии. Это может быть связано с высокой чувствительностью к изменению температуры одной из популяций микротрубочек (происходит разборка, деполимеризация). Остальные 65% устойчивых к холоду фракций [18] все же подвержены разрушающему действию осмиевой фиксации на полимеризацию тубулина. Поэтому, к сожалению, морфометрически микротрубочки не достаточно изучены – в основном регистрируют

лишь факт их присутствия в цитоплазме. Отдельные попытки исследования топографии микротрубочек свидетельствуют об их преимущественной ориентации вдоль длинной оси эндотелиоцитов. Мы полагаем, что при РГВ микротрубочки, помимо участия в контролировании формы клеток, играют основную роль во внутриклеточной компартментализации, определяя фрактальную геометрию трансцитоза и формирование путей предпочтительного перемещения эндосом. В настоящее время описаны два основных типа генерации движения везикул [17,18]. Первый механизм предполагает, что движение эндосом происходит вследствие скольжения одной цитоскелетной нити относительно другой. В этом случае контактные участки могут быть гомологичного и гетерологичного типов. Если одна цитоскелетная нить ассоциирована с клеточной мембраной, а другая с мембранами везикул, то при скольжении нити частицы будут двигаться толчками в ту или иную сторону, а длина нити не изменится. Однако такого рода предположения, вытекающие из данного механизма, не соответствуют результатам наших электронно-микроскопических исследований, в которых, в частности, показано существенное изменение длины микротрубочек при РГВ. Кроме того, трудно представить, как при такой организации трансцитоза обеспечивается относительная избирательность переноса. Существует иная возможность генерации движения везикул путем управляемой сборки – разборки цитоскелетных цепей, при этом длина нити должна изменяться, что согласуется с результатами наших экспериментов. Действительно, как отмечалось, в начале охлаждения увеличивается уровень цАМФ и происходит разборка тубулиновых нитей. Морфометрия электроннограмм показывает, что диаметр осмиофильных, вероятно норадренергических, одетых везикул существенно меньше расстояния между микротрубочками. Поэтому существует возможность их транспорта «на гребне волны» деполимеризации внутри разрушающегося тубулинового «туннеля» вплоть до момента потери контакта микротрубочек с плазмолеммой. В результате этого в зоне плотных контактов эндотелиоцитов будет происходить модификация подвижности и кластеризации интегральных белков мембраны, обусловливая известный феномен активации экзоцитоза после усиления эндоцитоза [17], и НА

поступит в открытую часть плотных контактов, которые, по нашему мнению, могут выступать в роли постоянных каналов. Продолжение гипотермического воздействия приводит к цГМФ-зависимому встречному процессу сборки тубулиновых нитей. Расстояние между микротрубочками меньше диаметра осмиофобных, предположительно ацетилхолинергических, одетых везикул. Поэтому они в принципе могли бы сшивать клатриновыми «иглами» нити тубулина и двигаться навстречу деполимеризационной волне, которая, достигнув «клатриновой пробки», обнажит ацетилхолинергическую везикулу. На этой стадии она, в отличие от норадренергического пузырька, открыта для слияния с временными водными каналами, обильно образующимися к 30–60-й минуте РГВ. В дальнейшем уровень цГМФ падает, а цАМФ-зависимая деполимеризация микротрубочек продолжает усиливаться. Отмечается второй пик проницаемости ГЭБ для НА. Увеличение латеральной мембраны становится критическим, что, возможно, приводит к запредельному растяжению плотных контактов. В этот момент из дубликатуры базальной мембраны, как в воронку, засасываются, соскальзывают отростки фагоцитирующих перицитов, которые утилизируют из каналов оставшиеся запасы транспортируемых нейромедиаторов. Проницаемость ГЭБ для АХ и НА снижается, завершается первый цикл в каскаде центральных механизмов регуляции теплопродукции.

Описанная гипотетическая модель избирательной проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейротрансмиттеров, опираясь на ряд прямых нейрохимических и микроскопических доказательств, хорошо объясняет и некоторые результаты электрофизиологических исследований на уровне целостного организма. Так, из предполагаемой схемы следует, что при одновременной активации сходной интенсивности симпатических и парасимпатических процессов ацетилхолин- и норадреналин-содержащие клатриновые везикулы будут с большей вероятностью сталкиваться при встречном транспорте и преодолевать ГЭБ совместно по временным водным каналам, об этом и свидетельствует динамика ЧСС охлажденного организма, которая имеет синусоидальный характер как при системном введении одного АХ, так и при насыщении крови одновременно НА и АХ.

Таким образом, вероятно, существует возможность участия ГЭБ в нейротрансмиттерных механизмах обеспечения температурного гомеостаза. При гипотермических воздействиях на организм происходят периодическое увеличение секреции терморегуляторных нейромедиаторов, содержания цАМФ и цГМФ, NO и CO; противофазные повышения проницаемости ГЭБ для НА, АХ, серотонина; когерентности и фрактальной размерности биоэлектрической активности и ультраструктурных компонентов ГЭБ. При ритмической гипотермии проницаемость ГЭБ повышается тогда, когда синхронизируется геометрия эндотелиоцитов, синапсов, биоэлектрической и нейрохимической активности. Эти структуры и процессы изменяются таким образом, что их размерности становятся практически одинаковыми (~1,7 или ~1,3) при снижении резистентности ГЭБ к АХ или НА соответственно. Взаимоотношения НА и ГЭБ обеспечивает NO, а АХ – CO, при этом существенная разница во времени существования этих монооксидов может обусловить степень структурированности, сложность организации пространственно-временных паттернов мозга, гипо- или гиперактивность организма.

Отмеченные изменения структурно-функциональной активности ГЭБ являются, по нашему мнению, физиологически значимыми для стимуляции адаптационных механизмов. Возможно, некоторые из них реализуются и при уникальной природной адаптации к низким температурам – зимней спячке (гибернации). На разных этапах различных режимов гипотермии на субклеточном уровне в эндотелии капилляров можно найти как однотипные, так и особые преобразования, определяющие специфику способа охлаждения.

Так, при длительных ритмических гипотермических воздействиях и гибернации путем многократной конформации микровильных комплексов могут формироваться специализированные морфофизиологические фрактальные системы, по форме напоминающие сильфоны, а также трансэндотелиальные узкие области (фрактальные поры) с чередованием персистентных и антиперсистентных компартментов и области в виде слоёв решёток с фрактальными связями (рис. 13, А, Б).

После гипотермических воздействий и при гибернации у 10% активных синапсов гипоталамуса формируется шипиковый

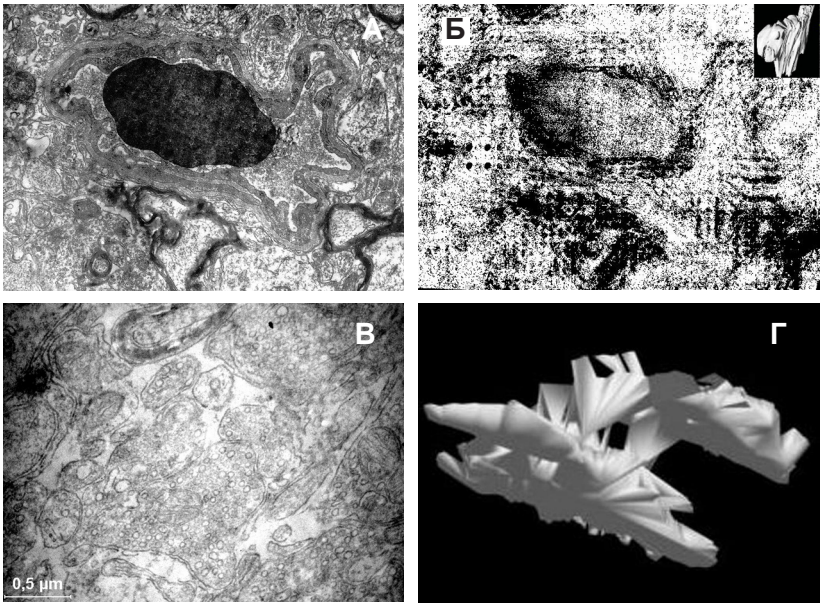


Рис. 13. Состояние ультраструктурных элементов эндотелиального звена ГЭБ и синаптического аппарата при гипотермии: А, Б – электронограмма фрагмента профиля капилляра при РГВ (×10000) и её области с *D*~1,7 (на врезке показана трёхмерная реконструкция сильфоновидного образования в эндотелиоците); В, Г – электронограмма и трёхмерная реконструкция синапсов гибернирующего мозга хомяка.

аппарат, состоящий из цистерн с чередованием персистентной и антиперсистентной геометрий. Большинство пресинаптических бутонов трансформируются, приобретая сложную, сильно разветвлённую, но единую трёхмерную ультраструктуру (рис. 13, В, Г).

При дальнейших исследованиях можно будет определить, насколько фрактальный рисунок подобных микроструктур специфичен для холодовых воздействий, может ли он быть объективным количественным индикатором структурно-функционального состояния ГЭБ охлаждённого мозга, и отражать сенситивные особенности центров терморегуляции. По нашему мнению, в структурно-функциональной организации ГЭБ при охлаждении

формируются специализированные морфофизиологические фрактальные системы, которые выполняют экзистоэнцефалическую функцию ГЭБ – поддержание гомеостаза функциональной геометрии мозга [30]. Благодаря избыточной робастности, фрактальное функционирование повышает адаптационные возможности систем, органов и тканей организма.

Авторы выражают искреннюю благодарность к.б.н. Марченко Ларисе Николаевне за неоценимую помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

Литература

1. Акмаев И.Г. Современные представления о взаимодействиях регулирующих си–стем: нервной, эндокринной и иммунной // Успехи физиол. наук. – 1996. – Т. 27, №1. – С. 3–19.
2. Аладжалова Н.А. Медленные электрические процессы в головном мозге. – М.: Акад. наук СССР, 1962. – 240 с.
3. Аладжалова Н.А. Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга. – М.: Наука, 1979. – 214 с.
4. Бабийчук В.Г. Влияние экстремальной криотерапии на морфофункциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 458–464.
5. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности роли оксида азота в механизмах адаптации животных к ритмическим холодовым воздействиям. Сообщение 1. Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови и миокарде молодых и старых животных после ритмических холодовых воздействий // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, №4. – С. 377–389.
6. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности роли оксида азота в механизмах адаптации животных к ритмическим холодовым воздействиям. Сообщение 2. Содержание конечных продуктов обмена NO в коре и гипоталамусе головного мозга молодых и старых животных после ритмических холодовых воздействий // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №1. – С. 25–37.
7. Бабийчук В.Г., Марченко В.С. Структурно-функциональное состояние гемато-энцефалического барьера гипоталамуса старых крыс при действии экстремального охлаждения // Світ медицини та біології. – 2005. – №3. – С. 91–94.
8. Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Бабийчук Г.А. и др. Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса // Проблемы криобиологии. – 2004. – №2. – С. 62–70.
9. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Грищенко В.И., Бабийчук В.Г. К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 4. Фрактальная морфометрия триггерных структур терморегуляции при холодовом стрессе // Проблемы криобиологии. – 2002. – №4. – С. 30–40.
10. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – К.: Наук. думка, 1992. – 207 с.
11. Бабійчук В.Г. Вплив екстремального охолодження на показники вегетативної регуляції серцевого ритму у щурів різних вікових груп // Наук. вісник НАУ. – 2008. – №126 – С. 34–41.
12. Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Марченко Л.Н. Структурно-функциональное состояние гематоэнцефалического барьера при ритмическом действии положительных (12°С) и экстремально низких (–120°С) температур // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2008. – Т. 4, №1. – С. 68–74.

13. Баевский Р.М., Кириллов О.И., Клецкин С.З. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе. – М.: Наука, 1992. – 208 с.
14. Белявский Е.М., Арчакова Р.И., Нетуков Н.И. Структурно-функциональная организация центра терморегуляции в нормальных условиях и при развитии лихорадки. – Минск: Наука и техника, 1989. – С. 18–43.
15. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 408 с.
16. Виру А.А. Динамика реакции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при стрессе // Успехи соврем. биологии.– 1979. – Т. 87, №2.– С. 271–288.
17. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз – М., 1987. – 95 с.
18. Глебов Р.Н. Свойства, структура и функции сократительных белков мозга и надпочечников. Механо-химическая природа секреторных процессов // Итоги науки и техники. Серия: «Биологическая химия». – М., 1982. – Т. 17. – С. 132–147.
19. Диверт В.Э. О механочувствительности периферических термосенсоров // Тез. докладов IV съезда физиологов Сибири. – Новосибирск, 2002. – С. 78.
20. Диверт В.Э., Комлягина Т.Г. О связи кровоснабжения конечности и локальных кожных термоощущений: Тез. докладов IV съезда физиологов Сибири. – Новосибирск, 2002. – С. 78–79.
21. Илюхина В.А. Физиология функциональных состояний головного мозга человека в норме и при патологии // Механизмы деятельности мозга человека. Часть 1. Нейрофизиология человека / Под ред. Н.П. Бехтеревой. – Л.: Наука, 1988. – С. 358–425.
22. Кассиль Г. Н. Гемато-энцефалический барьер. Анатомия, физиология, методы исследования, клиника. – М.: АН СССР, 1963. – 408 с.
23. Киричек Л. Т. Динамика реакции напряжения у крыс в условиях экспериментальной гипокинезии разной продолжительности и возможности ее коррекции // Косм. биология и авиакосмич. медицина. – 1980.–Т. 14, №1.– С. 72–74.
24. Майзелис М.Я. Современные представления о гематоэнцефалическом барьере: нейрофизиологические и нейрохимические аспекты // Журнал высш. нервн. деятельности. – 1986. – Т. XXXVI. – Вып. 4. – С. 611–626.
25. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул // Успехи физиол. наук. – 1996. – Т. 27, №4. – С. 30–43.
26. Марченко В.С. К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 1 // Проблемы криобиологии – 1997.– №4.– С. 14–20.
27. Марченко В.С. Функціональна архітектоніка гематоенцефалічного бар'єра в центральних механізмах терморегуляції при гіпотермії і гібернації // Наук. вісник НАУ. – 2008. – №126. – С. 88–97.
28. Марченко В.С., Бабийчук В.Г. Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии // Проблемы криобиологии. – 2001. – №4. – С. 17–29.
29. Марченко В.С., Бабійчук Г.О., Марченко Л.М. Структурно-функціональний стан гематоенцефалічного бар'єра при ритмічних та безперервних гіпотермічних впливах на організм щурів // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 386–390.
30. Марченко В.С., Грищенко В.И., Бабийчук В.Г. и др. К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга.Часть 6.Фрактальная геометрия функциональной архитектоники ультраструктурных элементов синаптического аппарата центральной терморегуляции при гипотермии и гибернации // Проблемы криобиологии.– 2003. – №3. – С. 6–19.
31. Матурана У.Р., Варела Ф.Х. Древо познания. – М.: Прогресс-Традиция, 2001.– 224 с.
32. Меврсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика.– М.: Наука, 1981.– 280 с.
33. Механизмы деятельности мозга человека. Часть 1. Нейрофизиология человека / Под ред. Н.П. Бехтеревой. – Л.: Наука, 1988. – 677 с.
34. Науменко А.В, Вигаш М., Поленов А. Л. и др. Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. – Новосибирск: Наука, 1990.– 230 с.
35. Орел В.Е., Сівкович С.О., Зотіков Л.О. та ін. Теорія хаосу та злоякісні лімфоми // Журнал АМН України. – 2006. – Т. 12, №2. – С. 209–228.
36. Пастухов Ю.Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Терморегуляция. Информ. бюл.– 1991.– Вып. 2. – С. 7–18.

37. Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии нервной системы // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1997. – Т. 123, №5. – С. 484–490.
38. Розин В.Г. К чему пришло математическое моделирование в физиологии (на примере терморегуляции // Тез. докладов IV съезда физиологов Сибири. – Новосибирск, 2002. – С. 239–240.
39. Росин Я.А. Нейро-гуморальная регуляция и гематоэнцефалический барьер. – М.: 1961. – 264 с.
40. Росин Я.А. Регуляция функций. – М.: Наука, 1984. – 172 с.
41. Селье Г. Стресс без дистресса. – Рига: Виеда, 1992. –109 с.
42. Словарь физиологических терминов. – М.: Наука, 1987. – 449 с.
43. Стабровский Е. М. Реакция энтерохромаффинной системы крыс на охлаждение // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 1972.– Т. 74, №10.– С. 32–34.
44. Степанова С. И. Биоритмологические аспекты проблемы адаптации.– М.: Наука, 1986. – 244 с.
45. Судаков К. В. Новые акценты класической концепции стресса // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1997.– Т. 123, №2 – С. 124–130.
46. Ткаченко М.М. Оксид азоту та судинна регуляція (огляд літератури) // Журнал АМН України. – 1997. – Т. 3, №2. – С. 241–254.
47. Федотчев А.И., Бондарь А.Т. Неспецифические механизмы адаптации ЦНС к прерывистым раздражениям, спектральная структура ЭЭГ и оптимальные параметры ритмических сенсорных воздействий // Успехи физиол. наук. – 1996. – Т. 27, №4. – С. 44–61.
48. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. – М.: Мир, 1987. – 17 с.
49. Шерстнева О. С, Сауля А. И., Гуменюк С. С. и др. Некоторые вопросы центро-периферических отношений при воздействии стрессоров // Актуальные проблемы стресса.– Кишинев: Штиинца, 1976.– С. 259–268.
50. Штерн Л.С. Об основных путях развития исследований по гисто-гематическим барьерам // Развитие и регуляция гистогематических барьеров. – М.: Наука, 1967. – С. 3–10.
51. Эмирбеков Э. З. Динамика азотистых метаболитов мозга при многократной гипотермии и последующем самосогревании // Космич. биология и авиакосмич. медицина.–1973.–Т. 7, №1.– С. 14–17.
52. Эфрос А.Л. Физика и геометрия беспорядка. – М.: Наука, 1982. – 176 с.
53. Юрасов В. Ф. Дыхание и кровяное давление при охлаждении различных отделов головного мозга // Регуляция дыхания в норме и патологии. – Куйбышев, 1968. – Т. 50. – С. 251–262.
54. Aoki Ch., Siekevitz Ph. Ontogenetic changes in the cyclic adenosine 3`,5`-monophosphate-stimulatable phosphorilation of cat visual cortex proteins, particularly of microtubule-associated protein 2 (MAP2) // J. Neuroscience . – 1985. – Vol. 5, №9. – P. 2465–2483.
55. Armario A., Lopez–Calderon A., Jolin T., Balasch J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation // Neurosci. Biobehav. Rev.– 1986.– Vol. 10 – P. 245–250.
56. Babijchuk G.A., Babijchuk V.G., Marchenko V.S. Electrogenesis of cooled brain during hypothermia and hibernation // Proceedings of the international conference «CRYOBIOMOL 2003», 14–18th Sept. – Coimbra, Portugal, 2003. – P. 110.
57. Bligh J. Neuronal models of hypothalamic temperature regulation: hypothalamus in temperature regulation // Recent studies of hypothalamic function / Ed. by K. Lederis, K.E. Cooper. – Basel: Karger, 1974. – P. 315–327.
58. Boje K.M. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis // Brain Res. –1996. –Vol. 720, №1,2. – P. 75–83.
59. Cannon W. B. The interrelation of emotions as suggested by recent physiological researches // Amer. J. Physiol.– 1914. – Vol. 25. – P. 256–287.
60. Egdahi R. H., Richards J. B. Effect of extreme cold exposure on adrenocortical function in the unanesthetized dog // Amer. J. Physiol.– 1956. – Vol. 185, №2.– P. 239–242.
61. Hoff F. Unspezifische Abwehrvorgange // Unspezifische Therapie. – Stuttgart: Thieme, 1957.– P. 19–21.
62. Ingi T., Ronnett G.V. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfac-

tory receptor neurons // J. Neurosci. –1995. –Vol. 15, №12. – P.8214–8222.
63. Knigge K. M., Penrod C. H., Schindler W. J. In vitro and in vivo adrenal corticosteroid secretion following stress // Amer. J. Physiol.– 1959. –Vol. 196, №3 – P. 579–582.
64. Lutsenko D.G., Sleta I.V., Marchenko V.S. Functional value of fractal organization of microhemocirculation bed under cold stress // Eur. J. Med. Res. – 2007. –Vol.12, Supplement IV. – P. 96.
65. Mandelbrot B.B. The fractal geometry of nature. – New York: Freeman, 1983. – 468 p.
66. Marchenko V.S. Neuronal gas (NO and CO) in the mechanisms of permeability of the blood-brain barrier of the cooled brain // Problems of Cryobiology. – 1997. – №3. – P. 57–59.
67. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in histamine-induced increases in permeability of the blood-brain barrier // Brain Res. – 1996. – Vol. 743, №1–2. – P. 70–76.
68. Myers R. Hypothalamic control of thermoregulation: neurochemical mechanisms // Handbook of the hypothalamus / Ed. P.J. Morgane, J. Pankepp. – New York: Dekker, 1980. – Vol. 3. – P. 83–210.
69. Nag S. Role of the endothelial cytoskeleton in blood-brain-barrier permeability to protein //Acta Neuropathol. –1995. – Vol. 90, №5. – P. 454–460.
70. Oztas B., Kaya M., Camurcu S. Influence of profound hypothermia on the blood–brain barrier permeability during acute arterial hypertension // Pharmacil. Res. – 1992. Vol. 26, №1. – P. 75–85.
71. Sharma H.S., Dey P.K. Influence of long-term acute exposure on regional blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow and 5-HT level in conscious normotensive young rate // Brain. Res. – 1987. – Vol. 424, №1. – P. 153–162.
72. Shukla A., Dikshit M., Srimal R.C. Nitric oxide-dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain // Experientia. – 1996. – Vol. 52, №2. – P. 136–140.
73. Trout J.J., Koenig H., Goldstone A.D., Lu C.Y. Blood-brain barrier breakdown by cold injury. Polyamine signals mediate acute stimulation of endocytosis, vesicular transport and microvillus formation in rat cerebral capillaries // Lab. Investigation.– 1986. – Vol. 55.– №6. – P. 622–631.
74. Zhuo M., Small S.A., Kandel E.R., Hawkins R.D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus // Science.– 1993. – Vol. 260, №5116. – P. 1946–1950.

Применение био- и нанотехнологий для создания и исследования состояния криоконсервированных клеточных препаратов

В.И. Грищенко[1], Е.И. Гончарук[1], Н.А. Волкова[1]*,
Е.В. Павлович[1], М.С. Юхта[1], А.А. Коструб[2],
Р.И. Блонский[2] , И.А. Засаднюк[2]

[1]Отдел криобиологии системы репродукции
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
электронная почта: volkovanatali2006@yandex.ru
[2]Отдел спортивной и балетной травмы
ГУ «Институт травматологии и ортопедии АМН Украины»,
ул. Воровского, 27; г. Киев, Украина 01054

Достижения молекулярной и клеточной биологии создали научную основу для развития современных клеточных биотехнологий. Изучение в эксперименте стволовых клеток – основное направление современных фундаментальных исследований в области биомедицинских клеточных технологий. В регенеративной медицине для восстановления функций органов и тканей, утраченных вследствие приобретенной патологии или наследственности, используют клеточные препараты, полученные из тканей фетоплацентарного происхождения или из тканей взрослого организма [2, 10, 22, 18]. Данные препараты выпускают в виде суспензий клеток, клеточных культур, а также направленно дифференцированных клеток. Клеточные препараты фетального происхождения являются уникальным материалом для клеточной терапии благодаря наличию в своем составе большого количества стволовых клеток,

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 705–718.
© В.И. Грищенко, Е.И. Гончарук, Н.А. Волкова и др., 2012

низкой иммуногенности и высокому регенеративному потенциалу. Учитывая морально-этические аспекты, возникающие при использовании в работе фетальных тканей, сегодня в качестве модельного объекта в биомедицинских технологиях используют мезенхимальные стромальные клетки (МСК), источниками которых являются костный мозг, жировая ткань, плацента, амнион, кордовая кровь и др. [5, 9, 31]. Интерес к МСК обусловлен их высоким пролиферативным потенциалом и способностью к направленной дифференцировке. Мезенхимальные стромальные клетки, полученные из тканей фетоплацентарного комплекса и взрослого организма, имеют близкие морфологические и фенотипические характеристики [7, 28].

Для создания запаса стволовых клеток с целью их дальнейшего применения необходимо их низкотемпературное консервирование. Для получения криоконсервированных препаратов без снижения их первоначальных характеристик проводятся разработка программ криоконсервирования и условий отогрева, а также подбор криопротекторов [4, 11, 15, 17]. Непосредственно перед использованием препаратов после низкотемпературного хранения необходима их тщательная оценка по морфологическим параметрам, а именно: по показателю жизнеспособности, способности к колониеобразованию, а также по иммунофенотипированию. Применение новых нанотехнологических подходов для исследования состояния клеточных препаратов после криоконсервирования и их детекции в организме реципиента после введения дает возможность получить новые знания о механизме действия стволовой клетки.

В течение многих лет нами проводились исследования по созданию перспективных криоконсервированных препаратов для клеточной терапии из фетальных тканей. Результатом работы было создание иммунобиологических препаратов группы «Криоцелл»: «Гемоклетки», «Криоцеребрум», «Гемонейронал», применение которых позволило с успехом лечить такие заболевания, как нарушения гемопоэза, анемия, инсульт, эпилепсия, болезни Паркинсона и Альцгеймера, иммунные и эндокринные патологии, воспалительные процессы, дистрофия роговицы, диабетическая ретинопатия и др. [8, 12, 13, 18, 23].

В настоящее время разработаны индивидуальные программы для криоконсервирования различных видов клеточных суспензий [12, 25]. Подобранные программы криоконсервирования позволяют получить однородную конечную суспензию стволовых клеток с сохраненной функциональной активностью и терапевтической эффективностью. Исследование морфологического и антигенного состава криоконсервированных суспензий клеток, полученных из печени эмбрионов человека на сроках гестации до 12 недель, показало, что содержание $CD34^+$-клеток составило 2,3–25,8% от общего количества клеток [7], из которых лишь 30 ± 2% являются $CD133^+$, а 30 ± 1% – $CD38^-$. При этом колониеобразующая активность клеток, полученных из печени эмбрионов 6–8 недель гестации, значительно выше, чем клеток эмбрионов 9–12 недель [33].

В результате дальнейших исследований механизмов действия и терапевтической эффективности фетальных клеток была создана новая форма препаратов на носителях. Это позволило создать в очаге поражения клеточное депо, которое пролонгирует и усиливает действие препарата за счет длительного пребывания его клеточного компонента в *locus minoris*. Накопленный опыт по применению синтетических и природных биодеградируемых материалов как носителей для клеток помог разработать препарат «Эмбриогель», содержащий культивированные криоконсервированные клетки и гель метилцеллюлозы, который депонирует их определенное время после нанесения, предохраняет от высыхания, образуя воздухопроницаемую защитную пленку, создающую барьер для проникновения чужеродных агентов в рану, и сохраняет клетки жизнеспособными [8, 21].

Разработана технология культивирования клеток хориона, изучены свойства полученных культур, отработаны методы эффективного криоконсервирования, направленные на сохранность стволовых клеток в препарате. В наших исследованиях показано, что клетки хориона на начальных этапах культивирования характеризуются гетерогенностью, что проявляется наличием двух различных по морфологии клеточных типов [4, 6, 24]. Это активно пролиферирующие длинные клетки веретенообразной формы и небольшие клетки звездчатой формы с низкой скоростью пролифе-

рации. При дальнейшем культивировании (3–4-й пассаж) пролиферативная активность клеток хориона стабилизируется и увеличивается по сравнению с первичными культурами. Клетки культуры хориона характеризуются фибробластоподобной морфологией (рис. 1, А). Наряду с морфологическими исследованиями проводится мониторинг состояния клеток в культуре на наличие апоптотических клеток. На рис.1, Б представлено микрофото культуры клеток хориона без признаков апоптоза. Для подтверждения наличия в исследуемой культуре стволовых клеток проводились исследования способности клеток к направленной дифференцировке. Полученные результаты свидетельствуют о том, что культура клеток хориона имеет потенциал к дифференцировке в мезенхимальном направлении (адипогенном, хондрогенном и остеогенном).

В рамках доклинических испытаний проведена сравнительная оценка влияния введения суспензии и культуры клеток хориона после криоконсервирования на течение регенеративных процессов ожоговых ран, дефекта суставного хряща и тендопатии. В экспериментах на животных показано, что клеткам хориона присущ выраженный ранозаживляющий и противовоспалительный эффект, а их применение ускоряет процессы регенерации ожоговых ран IIIА-степени. Проведенные гистологические исследования показали, что после аппликации нативных клеток хориона на 20-е сутки

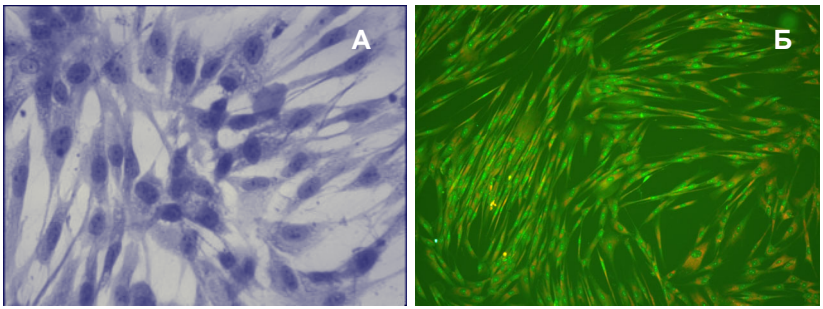


Рис. 1. Культура клеток хориона 2-й пассаж, 12 сутки культивирования: А – световая микроскопия. Окраска гематоксилином и эозином, ×200; Б – люминесцентная микроскопия. Окраска акридиновым оранжевым, ×120.

полностью восстановливается структура кожи в зоне ране-вого дефекта. При этом аппликация культивированных клеток хориона способствует более выраженному репаративному действию по сравнению с некультивированным аналогом [6]. Введение в зону дефекта сустава культуры криоконсервированных клеток хориона приводит к формированию гиалиноподобной хрящевой ткани. У животных контрольной группы (без клеточной терапии) в зоне дефекта отмечалось наличие гранулярной соединительной ткани с признаками дистрофии и некроза. Показано, что введенные донорские клетки встраиваются в поврежденную архитектонику хряща и способствуют восстановлению дефекта [5].

Результаты гистологического исследования показали, что локальное введение культуры клеток хориона в дегенеративно-дистрофически поврежденное сухожилие положительно влияет на реституцию его структурно-функционального состояния, что проявлялось в остановке прогрессирования дистрофических изменений, активизации процессов пролиферации и репарации в зоне повреждения с признаками регенеративного восстановления гистологической структуры ткани сухожилия.

Терапевтическая эффективность культивированных клеток хориона обусловлена как мощным пролиферативным потенциалом, высокой пластичностью и низкой иммуногенностью клеток, так и активизацией процессов синтеза, продуцированием ряда гормонов, а также факторов роста, стимулирующих пролиферацию всех типов клеточных элементов, участвующих в процессе регенерации. Представленные результаты, полученные в исследованиях клеток хориона *in vivo* и *in vitro*, позволяют считать данный препарат перспективным для применения в биотехнологических и медицинских целях.

На сегодняшний день исследовательская деятельность направлена на изучение свойств стволовых клеток разного уровня дифференцировки, выделенных из собственных тканей пациентов для их дальнейшего применения в клинической практике. Наиболее отработанным и востребованным является получение мультипотентных МСК и клеток кожи человека. Нами проводится выделение МСК из таких тканевых источников, как костный мозг и жир.

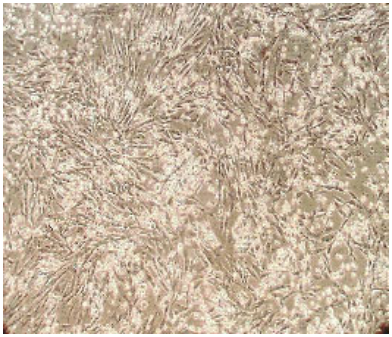


Рис. 2. Культура МСК. 21-й день культивирования, ×160.

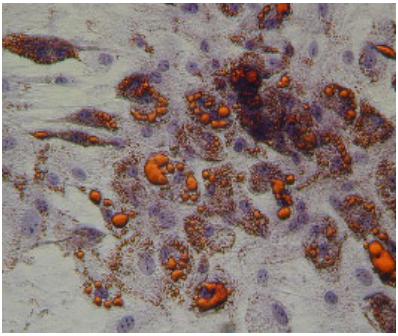


Рис.3. Адипогенная дифференцировка культуры МСК на 20-е сутки культивирования, окраска Sudan III, ×200.

Этапы оценки структурно-функциональных характеристик МСК включают в себя культивирование, дифференцирование, криоконсервирование и изучение способности к адгезии и пролиферации после деконсервирования (рис. 2, 3). Используя высокую адгезивную способность МСК к пластику, можно достаточно эффективно выделить мононуклеарную фракцию из первичной клеточной суспензии, а дальнейшее культивирование клеток стромы обеспечивает максимальную очистку от клеток гемопоэтического ряда и приводит к увеличению однородности клеточной популяции.

Разработаны технологии получения культур фибробластов и кератиноцитов кожи. Их применение с терапевтической целью на данный момент представляет серьезную альтернативу традиционным методам лечения долго незаживающих ран. В экспериментах на лабораторных животных доказана высокая репаративная активность аллофибробластов при терапии таких повреждений. Эти результаты могут быть основой нового подхода в лечении трофических язв, ожогов и долго незаживающих ран у человека. В качестве иммобилизатора клеток целесообразно использовать гель метилцеллюлозы, который, как нами было экспериментально доказано, усиливает репаративный потенциал фибробластов [1]. Перспективным направлением является изучение регенеративного

потенциала аутофибробластов для терапии экспериментальных дегенеративно-дистрофических повреждений сухожилий. Внутрисухожильное введение культуры аутологичных фибробластов при дегенеративном повреждении ахилловых сухожилий способствует репаративному восстановлению структурной организации его тканей, которое характеризуется выраженными изменениями в гистологической картине на 7 и 21-е сутки с практически полным восстановлением его структуры на 45-е сутки наблюдения [14, 20].

Актуален вопрос применения культивированных как нативных, так и консервированных МСК в случаях травматических и дегенеративных повреждений опорно-двигательного аппарата. Показана эффективность применения нативных и дифференцированных в хондрогенном направлении МСК костного мозга в терапии посттравматического повреждения суставного хряща, которая проявляется через образование гиалиноподобной хрящевой ткани в зоне дефекта (рис. 4, 5). Показано, что введенные донорские клетки, меченные РКН-26, встраиваются в архитектонику хряща и способствуют восстановлению хрящевой ткани, которая по своим показателям соответствует утраченной [3]. Анализ полученных данных по применению МСК при экспериментальных дегенеративно-дистрофических патологиях межпозвонковых дисков

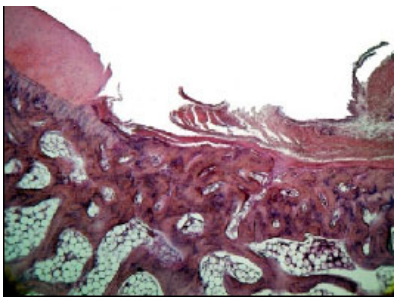


Рис. 4. Микрофото зоны дефекта суставного хряща. 45 суток с момента введения NaCl. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

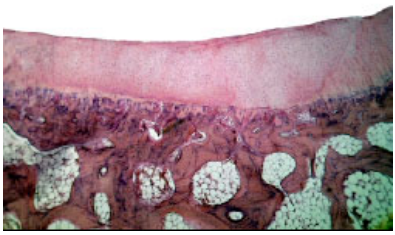


Рис. 5. Микрофото зоны дефекта суставного хряща. 45 суток с момента введения культуры аутологических МСК. Окраска гематоксилином и эозином, ×200.

и сухожилий свидетельствует о стимулирующем влиянии клеточной терапии на течение репаративных процессов. Так, результаты микроскопического исследования гистологических препаратов ахилловых сухожилий животных с терапией аутологичными МСК свидетельствуют о нормализации интенсивности окрашивания клеточных элементов и сухожильных волокон, увеличении количества клеточных элементов, полном восстановлении четкости контуров сухожильных волокон [14, 31]. Подобным образом влияют культуры аллогенных МСК на процессы хондрорепарации в дегенеративно измененных межпозвонковых дисках. Проведенные компьютерно-томографические и гистологические исследования показали, что после локального введения криоконсервированных МСК на носителе в дегенеративно измененный межпозвонковый диск крыс обнаруживаются достаточно четкие признаки его восстановления: увеличивается высота диска, исчезают разволокнения коллагеновых волокон, трещины и щели, а главное восстанавливается клеточность его структурных элементов (рис. 6, 7) [30].

Одним из важнейших направлений клеточной биологии и клеточной терапии является мониторинг состояния клеток как *in vitro*,

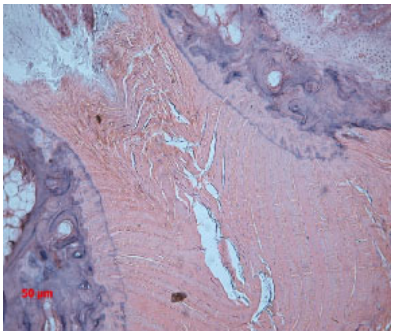


Рис. 6. Микрофото зоны дистрофического повреждения межпозвонкового диска крысы после 60 суток компрессии. Окраска гематоксилином и эозином.

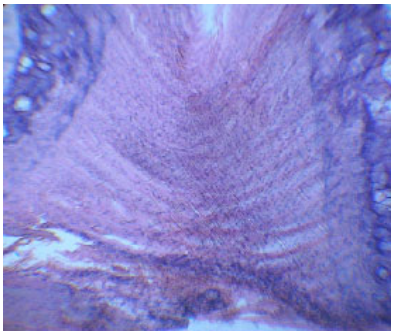


Рис.7. Микрофото зоны межпозвонкового диска крысы на 60-е сутки после терапии МСК. Окраска гематоксилином и эозином, ×150.

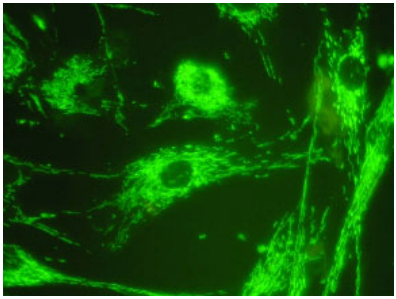


Рис. 8. Зонд DiOC9 в клетках культуры фибробластов, люминесцентная микроскопия, ×200.

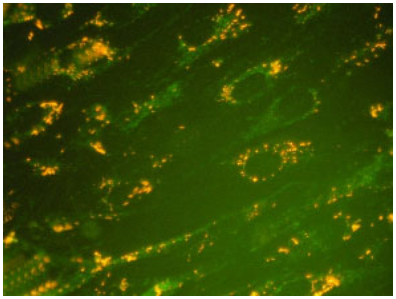


Рис. 9. Карбоцианиновый зонд JC-1 в клетках культуры фибробластов, люминесцентная микроскопия, ×200.

так и *in vivo*. Высокочувствительные люминесцентные зонды и нанолюминофоры, связывающиеся с органеллами клетки, дают возможность визуального наблюдения процессов, происходящих внутри клетки.

С целью мониторинга состояния клеток при долговременном культивировании и под действием факторов криоконсервирования проведены исследования по использованию флавоновых и стириловых зондов BQBF, F2N8, PPZ8, ДСМ, ФМЕ. Сравнение применения карбоцианиновых, флавоновых и стириловых люминофоров для мечения клеток *in vitro* показало, что карбоцианиновые зонды наиболее пригодны для оценки состояния клеток. Была показана способность красителей карбоцианинового ряда (DiOC2, DiOC9, DiOC18) длительно сохраняться и не изменять свои свойства в культивируемых клетках (рис. 8, 9) [15, 26, 29].

Установлено, что зонд JC-1 может быть использован для экспресс-диагностики состояния клеток, в том числе до и после криоконсервирования. Данный зонд при совместном культивировании меченых и немеченых клеток морфологически отличных культур демонстрирует отсутствие межклеточного перехода зонда. Отражая состояние мембранного потенциала митохондрий, JC-1 указывает на сохранность функции этих органелл, позволяя отследить

изменения жизнеспособности и функциональной активности стволовых клеток под влиянием различных факторов окружающей среды [15, 19, 26, 29].

В работах по оперативному тестированию и мечению криоконсервированных клеточных культур на этапах хранения и исследования разработан метод мечения наночастицами оксида европия клеток диплоидных культур и перевиваемых линий. Установлено, что клетки СПЭВ (перевиваемая линия эпителия почки эмбрионов свиньи) и фибробласты человека с введенными наночастицами оксида европия люминесцировали в области эмиссии 540–647 нм, свечение было локализовано в цитоплазме и не наблюдалось в ядре клетки, фоновое свечение отсутствовало. При культивировании меченых клеточных культур было показано, что наночастицы сохраняются в клетках в течение 4-5 удвоений, при этом их локализация не изменяется, а интенсивность свечения незначительно уменьшается.

Проведены комплексные исследования токсического влияния наночастиц оксида европия на клеточные характеристики в культурах. При оценке токсического влияния в концентрациях 6,8–340 мкг/мл на жизнеспособность и адгезивные свойства клеток СПЭВ показано, что наночастицы в концентрациях 34 и 340 мкг/мл снижают показатель жизнеспособности клеток. Определена концентрация наночастиц оксида европия, составляющая 6,8 мкг/мл, которая не снижает жизнеспособность клеток и позволяет изучить динамику процессов, происходящих в клетке при длительной инкорпорации наночастиц. Установлено, что способность клеток к адгезии находится в обратной зависимости от концентрации инкорпорированных наночастиц оксида европия. При концентрациях НЧ 17 и 34 мкг/мл процесс адгезии замедляется. Показано, что концентрация НЧ 340 мкг/мл в клетках вызывает токсический эффект, угнетает процессы адгезии, пролиферации и приводит к клеточной гибели. Концентрация НЧ 6,8 мкг/мл не оказывает влияния на процессы адгезии и пролиферации клеток СПЭВ. Нами установлено, что при концентрациях НЧ оксида европия 17, 34, 78 и 102 мкг/мл пролиферативные свойства клеток снижаются. Однако проведенные с помощью ФАКС-анализа исследования показали отсутствие

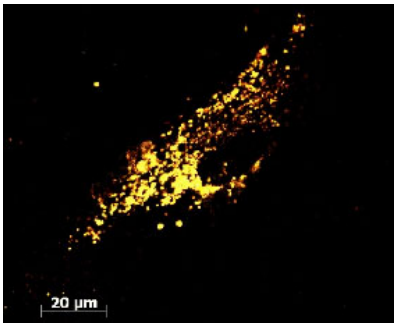


Рис. 10. Наночастицы оксида европия в клетке культуры фибробластов, конфокальная микроскопия.

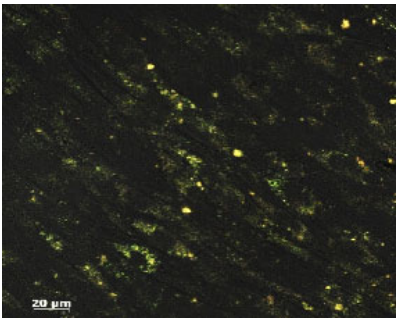


Рис. 11. Наночастицы оксида европия в культуре фибробластов, конфокальная микроскопия.

апоптотических процессов в клетках СПЭВ при концентрации НЧ 34 мкг/мл.

Установлена возможность использования наночастиц оксида европия (18–34 мкг/мл) для экспресс- и долгосрочного мечения клеток *in vitro* (рис. 10, 11) [27, 32]. Расширение возможностей оценки состояния клеток до и после низкотемпературного консервирования с использованием люминесцентных зондов и нанотехнологий позволяет получить всестороннюю характеристику материала.

Полученные результаты могут быть основой для создания банка стволовых клеток с возможностью их последующего применения в области клеточной терапии и биотехнологии. Представлен положительный эффект культивированных и криоконсервированных культур стволовых клеток при лечении повреждений опорно-двигательного аппарата и ожогов.

Изменение свечения зонда JC-1 отражает функциональное состояние клетки и является показательным тестом для выявления ее криоповреждений. Карбоцианиновый зонд JC-1 может применяться для мониторинга функционального состояния клеточных линий при криоконсервировании. Продолжается работа по вопросам длительного культивирования клеток со встроенными зонда-

ми разной этиологии, в том числе и люминесцирующих наночастиц, а также спонтанного перехода зондов из клетки в клетку. Перспективным является скрытое кодирование криоконсервированных образцов в криобанках.

Проведенные экспериментальные исследования криоконсервированных клеточных препаратов дают предпосылку для их дальнейшего применения в области новых биотехнологий, тканевой инженерии и последующего внедрения в клиническую практику.

Литература

1. Абрафикова Л.Г., Петренко Т.Ф., Высеканцев И.П. и др. Влияние нативных и криоконсервированных аллофибробластов на процессы регенерации кожных язв у крыс // Запорож. мед. журнал – 2010. – Т. 12, №2. – С.5–8.
2. Акопян А.С., Белоусов Д.Ю., Рысулы М.Р., Куликов А.В. Некоторые актуальные проблемы клинических исследований стволовых клеток // Качественная клин. практика. – 2010. – №1. – С. 22–28.
3. Волкова Н.О., Гончарук О.І., Засаднюк І.А. та ін. Застосування мезенхімальних стромальних клітин для відновлення хрящової тканини // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т.18, №4. – С. 496–498.
4. Гончарук О.І., Волкова Н.О., Грищенко В.І. Вплив кріоконсервування на проліферативні характеристики і потенціал диференціювання культивованих клітин хоріону // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 309–317.
5. Гончарук Е.И. Криоконсервированные клетки хориона – перспективный объект для биотехнологии // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №4. – С. 459–461.
6. Гончарук О.І., Волкова Н.О, Петренко Т.П., Грищенко В.І. Лікування термічних опіків у експериментальних тварин за допомогою суспензії клітин хоріона // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – №3. – С. 54–58.
7. Гончарук Е.И., Петренко Т.Ф., Волкова Н.А. и др. Экспрессия CD34 рецепторов на нативных и культивированных клетках эмбрионального происхождения // Проблемы криобиологии. – 2005. – №3. – С. 407–408.
8. Грищенко В.І., Гончарук О.І., Кощій С.В. та ін. Новий ембріональний препарат «Ембріогель»: характеристика та перспективи застосування // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, №1. – С. 20–23.
9. Грищенко В.И., Демин Ю.А., Гончарук Е.И. и др. Характеристика эмбрионального препарата «Гемонейронал» // Проблемы криобиологии. – 2001, №3. – С. 38–40.
10. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование). – К.: Наук. думка, 1988. – 192 с.
11. Гурина Т.М., Кирилюк А.Л., Петренко Т.Ф. и др. Влияние пороговой концентрации криозащитного раствора на жизнеспособность клеток диплоидной культуры человека в процессе их криоконсервирования // Эксперим. та клін. медицина. – 2008. – №1. – С. 81–84.
12. Демин Ю.А., Петренко А.Ю., Гончарук Е.И. Новый препарат «Гемонейронал» в комплексном лечении посттравматического гемофтальма // Укр. журнал эксперим. медицины. – 2001. – Т. 2, №4. – С. 57–61.

13. Дьомін Ю.А., Гончарук О.І., Літвінова Л.В. Препарат «Гемонейронал» у комплексній терапії центральної хоріоретинальної дистрофії // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, №1. – С. 28–30.
14. Коструб О.О., Грищенко В.І., Блонський Р.І. та ін. Оцінка впливу аутологічних клітинних культур на відновлення дегенеративно пошкодженого сухожилля в експерименті // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2011. – № 2. – С. 10–13.
15. Онищенко Е.В., Гончарук Е.И., Петренко Т.Ф. и др. Анализ состояния клеточных культур после криоконсервирования с использованием флуоресцентных зондов // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18. №3. – С. 292–296.
16. Петренко А.Ю., Грищенко В.И. Стволовые кроветворные клетки из разных источников // Международ. мед. журнал. – 2003. – №1. – С. 123–129.
17. Пат. №38303А Україна, МПК[7] A61K 35/34. Спосіб гіпотермічного зберігання фрагментів тканини печінки / В.І. Грищенко, Ю.Ю. Мікулінський, О.І. Гончарук та ін.; заявл. 21.06.00; опубл. 15.05.01, Бюл. №4.
18. Пат. №45693 Україна МПК[7] A61K 35/48, 35/30, 35/407. Препарат «Гемонейронал» для клітинної трансплантації і спосіб лікування судинних патологій органів зору / В.І. Грищенко, О.І. Гончарук, О.Ю. Петренко, Ю.А. Дьомін; заявл. 06.06.2001; опубл. 15.12.2004, Бюл. №12.
19. Пат. №47503 Україна, МПК[51], C12 N5/07 G01N21/64 C12N5/071. Спосіб мічення клітин при довгостроковому культивуванні / В.І. Грищенко, О.І. Гончарук, О.В. Павлович та ін.; заявл. 30.07.09; опубл. 10.02.10, Бюл. №3.
20. Пат. №61213 Україна, МПК A61B 17/56(2006.01). Спосіб лікування дефектів суглобового хряща / О.О. Коструб, О.Ю. Петренко, О.І. Гончарук та ін.; заявл. 29.12.2010; опубл. 11.07.2011, Бюл. №13.
21. Пат. №64540А Україна МПК[7] A61K 35/48, 35/407 Препарат «Ембріогель» для зовнішнього застосування та спосіб його отримання / О.І. Гончарук, С.В. Кощій, Т.П. Петренко та ін.; заявл. 24.06.2003; опубл. 16.02.2004, Бюл.№2.
22. Пат. №6521 Україна, МПК[7] A61K 35/34. Препарат «Культура диплоїдних клітин людини» для клітинної терапії / О.І. Гончарук, Т.П. Петренко, Н.О. Волкова, В.І. Грищенко; заявл. 20.09.2004; опубл. 16.05.2005, Бюл. №5.
23. Пат. №6522 Україна МПК[7] A61K 35/34 Спосіб лікування постраждалих з множинними та поєднаними пошкодженнями довгих кісток / В.В. Григорук, В.О. Литовченко, О.І. Гончарук та ін.; заявл. 20.09.2004; опубл. 16.05.2005, Бюл.№5.
24. Пат. №74976 Україна, МПК[7] A61K 35/50, A61P 17/02. Препарат для лікування опіків на основі клітин хоріону, спосіб його приготування і спосіб лікування / О.І. Гончарук, Т.П. Петренко, О.В. Павленко та ін.; заявл. 19.08.04.; опубл. 15.02.06, Бюл. №2.
25. Goncharuk E.I., Borovoy I.A., Pavlovich E.V. et al. Newly synthesized carbocyanine fluorescent probes, their characteristics and behavior in proliferating cultures // Biopolymers and Cell. – 2009. – Vol.25, N6. – P.484–491.
26. Goncharuk E.I., Dyubko T.S., Timon V.V., Grischenko V.I. Influence of fluorescent probes of different structure on confluent cell cultures // MAF10, 10th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, 9–12 September 2007. – Salzburg, 2007. – P. 288.
27. Grischenko V.I., Pavlovich E.V., Goncharuk E.I. et al Nanoluminophores of europium and lantanum oxides as long-term markers of cryopreserved cells // Application of Cryopreservation from Human Tissue Engineering to Plant Genebanbank Integration. 7–9 September 2009. – Gannover, 2009. – P. 45.
28. Hegyi B., Sagi B., Kovacs J. et al. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall // Int. Immunology. – 2010. – Vol. 22, №7. – P. 551–559.
29. Helgason C.D., Miller C.L. Basic cell culture protocols. – Humana Press Inc., 2005. – 371 p.
30. Iukhta M.S., Volkova N.A., Goncharuk E.I. Multipotent mesenchimal stromal cells restore degenerative changes of intervertebral discs in rats // The 4th International IMBC conference for young scientists «Molecular biology advances and perspectives».– Kyiv, 2011.– P. 192.

31. Kostrub O.O., Blonskyi R.I., Goncharuk O.I., Volkova N.O. Use of autological mesenchymal stem cells, autological fibroblasts and autological plazma rich in growth factor at treatment of degenerative damages of tendons (experimental research) // XXV Trennial World Congress. SICOT 2011. – Prague, 2011. – P. 53.
32. Pavlovich E.V., Ganina I.I., Volkova N.A. et al. Study of europium oxide nanoparticle interaction with cell cultures // MAF11, 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence. – Budapest, 2009. – P. 67.
33. Weekx S.F., van Bockstaele D.R., Plum J. et al. $CD34^{++}CD38^{-}$ and $CD34^{+}CD38^{+}$ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hemopoietic cytokines depending on the ontogenic source // Exp. Hematol. – 1998. – Vol. 26. – P. 1034–1042.

Экстракты криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят: получение и биологическое действие

С.Е. Гальченко*, Л.А. Рогоза,
И.В. Слета, Б.П. Сандомирский

Отдел экспериментальной криомедицины
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015
**электронная почта: sgalchenko@yandex.ru*

Исследованию биологической активности регуляторных пептидов (РП) все больше внимания уделяют специалисты разного профиля. Эти пептиды принимают участие в реализации механизмов экстремальных и шоковых состояний, соматических функций, в том числе регулируют процессы пролиферации, репарации и регенерации [10]. На сегодняшний день физиологически активные пептиды выделены практически из всех внутренних органов [13, 16, 19]. Считается, что их действие тканеспецифично [12].

Традиционным способом получения таких пептидов является кислотный гидролиз белков в предварительно обезжиренной ацетоном ткани того или иного органа животных с последующим выделением пептидов [12, 14].

В отделе экспериментальной криомедицины ИПКиК НАН Украины разработан способ получения экстрактов органов свиней и поросят, содержащих пептиды, с использованием криобиологических подходов [15]. Установлено, что после криоконсервирования фрагментов органов в присутствии криопротектора ПЭО-1500 и скорости охлаждения 1 град/мин с последующим отогревом на водяной бане с температурой 37°С увеличиваются выход пептидов в экстракт и их биологическая активность.

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 719–738.
© С.Е. Гальченко, Л.А. Рогоза, И.В. Слета, Б.П. Сандомирский , 2012

Высокая биологическая активность экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи, поджелудочной железы и печени новорожденных поросят, а также печени и селезенки свиней показана на таких экспериментальных моделях, как ожоговые и холодовые раны, аллоксановый сахарный диабет, карцинома Герена и т. д. [5–8].

Используемые сокращения
АлАТ – аланинаминотрансфераза
АсАТ – аспартатаминотрансфераза
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РП – регуляторные пептиды
СЭПС – смесь экстрактов криоконсервированных фрагментов печени и селезенки свиней
ТБКАП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
ТГ – токсический гепатит
ХЛ – хемилюминесценция
ЦП – цирроз печени
ЭПП – экстракт криоконсервированных фрагментов печени поросят
ЭПС – экстракт криоконсервированных фрагментов печени свиней
ЭСС – экстракт криоконсервированных фрагментов селезенки свиней
ЭСцС – экстракт криоконсервированных фрагментов сердца свиней
ЭСцП – экстракт криоконсервированных фрагментов сердца новорожденных поросят

В связи с тем, что биологическая активность препаратов из тканей животных связывается, в первую очередь, с наличием в них определенных пептидов, мы исследовали молекулярно-массовое распределение этих веществ в экстрактах криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят методом ВЭЖХ. Полученные результаты могут быть использованы для стандартизации пептидного состава экстрактов. Анализируя особенности молекулярно-массового распределения пептидов в экстрактах, можно отметить, что их состав в ЭПС и ЭПП (табл. 1) отличается как качественно, так и количественно. Хроматограмма ЭСС характеризуется 4 пиками.

Можно отметить различия состава пептидов в ЭСцС и ЭСцП, что свидетельствует о его зависимости от возраста животных, как и в случае ЭПС и ЭПП. Особенностями молекулярно-массового распределения пептидов в этих экстрактах является различное количество пиков – 3 в ЭСцС и 6 – в ЭСцП. Второй особенностью ЭСцС является отсутствие пика с м.м. 10 000

Таблица 1. Пептидный состав экстрактов криоконсервированных фрагментов органов

Молекулярная масса	Экстракты				
	ЭПС	ЭПП	ЭСС	ЭСцС	ЭСцП
>12000					0,5
>10000	42,6	6,7	23,1		2,8
6180	0,1				
5560		3,6			
5400	1,0				
4597					8,5
4400	0,6				
4200		1,0			
3895					31,9
3400	0,1				
2190	2,9				
1784		3,9		52,3	17,9
1490	8,7				
1296			22,5		38,4
1270	21,6				
1090	8,6	71,7	8,1		
1061				3,9	
810	11,1	10,1	46,2		
630	1,6				
500	0,9				
420				43,8	

и больше, который наблюдался на хроматограммах всех исследованных ранее экстрактов криоконсервированных фрагментов органов: печени, селезенки (см. табл. 1), поджелудочной железы и кожи половозрелых свиней и новорожденных поросят, а также селезенки свиней [3]. Также можно отметить, что на хроматограммах ЭСцС регистрируются два пика, которые отвечают низкомолекулярным пептидам, и которые отсутствуют на хроматограммах ЭСцП. А в ЭСцП определяются более высокомолекулярные пептиды, которые отсутствуют в ЭСцС. Также в ЭСцП регистрируются пептиды с м. м. 12 000, которые не регистрировались в других экстрактах. При этом общим для обоих экстрактов сердца является только один пик, который соответствует средней м. м. пептидов 1784.

Возрастные различия в составе экстрактов могут быть связаны с различным физиологическим состоянием клеток печени или сердца новорожденных поросят и половозрелых свиней, в том числе с различной пролиферативной активностью.

Одной из особенностей физиологически активных пептидов есть то, что они образуются из белковой молекулы предшественника путем протеолиза. Образуются они в определенной ткани или органе в соответствии с потребностями организма [13]. По-видимому, в ответ на стресс, вызванный криоконсервированием фрагментов органов, и запускаются механизмы образования пептидов с соответствующей биологической активностью. А их спектр зависит от возраста животных, который определяет адаптационные возможности органа и его способность к физиологической и репаративной регенерации.

Многие научные коллективы добились значительных успехов в получении синтетических молекул отдельных пептидов [10, 12, 13]. Однако для создания синтетического пептида или определения его возможного механизма действия необходимо знать его строение. Для такого анализа требуются современные методы исследований биологических молекул.

Масс-спектрометрический анализ позволяет регистрировать молекулы в виде заряженных ионов и с помощью калибровочных методов выявлять отношение массы исследуемой молекулы к за-

ряду с точностью до 2-го знака после запятой [18]. Тем самым можно определять молекулярные массы отдельных пептидов в экстрактах и сравнивать их с общедоступными базами данных молекул пептидной природы, что позволяет по молекулярной массе идентифицировать отдельные пептиды. Такие базы данных используются для накопления информации о строении молекул белков и пептидов.

В настоящее время в отделе экспериментальной криомедицины проводятся исследования по определению пептидов, входящих в состав различных экстрактов.

Масс-спектры пептидов определяли на приборе Autoflex II («Bruker Daltonics», Германия). Исследования проводили с использованием матриц синаповой кислоты («Fluka», Германия) и α-циано-4-гидроксикоричной кислоты («Fluka»). Анализ проводили по методу МАЛДИ на суммарных спектрах позитивных ионов (100 единичных спектров), полученных в линейном режиме сканирования. Матрицу смешивали с анализируемыми экстрактами в отношении 1:1 и наносили на стандартную стальную подложку. Исследования проводили в диапазоне м. м. 500–50 000. В качестве внешней калибровки прибора использовали бычий инсулин («Fluka») с м. м. 5 738.

В результате масс-спектрометрического исследования ЭСС, ЭСцП и ЭСцС выявлен ряд особенностей. Экстракт селезенки свиней содержит пептидные комплексы с м. м. пептидов до 10 000, ЭСцС – до 14 000, а ЭСцП – до 37 000.

Некоторые пики, например с м.м. 4 970 ± 5, присутствуют в ЭСС и ЭСцП, но не детектируются при исследовании ЭСцС. И наоборот, пики с м. м. 3 216 ± 5, 5 735 ± 5, 8 570 ± 5 отмечаются в обоих образцах экстрактов из сердца поросят и свиней. Данные экстракты также отличаются набором других пиков. В ЭСцП детектируются пик с м. м. 16 970 ± 5 и менее интенсивный пик, соответствующий м. м. 36 740 ± 5. Вариация молекулярной массы в пределах ± 5 может свидетельствовать о различном изотопном составе элементов исследуемых молекул.

Для определения влияния ЭСцС и ЭСцП на здоровых животных использовали крыс возрастом 1 (молодые) и 4 (половозрелые)

месяца. Экстракты с концентрацией пептидов 100 мкг/мл вводили в брюшную полость крыс на протяжении всего эксперимента. Доза пептидов составляла 50 мкг на 100 г массы животного.

Из эксперимента животных выводили путем декапитации. Сердца взвешивали и помещали в 10%-й раствор нейтрального формалина. Парафиновые блоки для проведения морфологических исследований изготавливали по стандартной методике. Микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином. Исследования препаратов проводили на микроскопе «Meiji Techno» (Япония). Для обработки изображений использовали программу «AxioVision Rel.4.8» («Carl Zeiss», Германия).

Электрокардиограммы (ЭКГ) животных регистрировали на аппаратно-программном комплексе «Поли-Спектр» («Нейрософт», Россия). По ЭКГ определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС) в минуту и показатели сердечного ритма: VLF – мощность спектра в диапазоне очень низких частот (0,0033–0,04 Гц); LF – мощность спектра в диапазоне низких частот (0,04–0,15 Гц); HF – мощность спектра в диапазоне высоких частот (0,15–0,40 Гц) и SDNN – стандартное отклонение (SD) нормальных RR интервалов.

При введении ЭСцС или ЭСцП крысам на протяжении 28 суток не наблюдалось никаких изменений в общем состоянии и поведении животных: они оставались активными, пищу поедали полностью, пили по мере необходимости, нормально реагировали на прикосновение. Введение экстрактов также не влияло на скорость изменения массы животных и сердец по сравнению с контролем.

При подсчете плотности ядер клеток на срезах ткани сердца половозрелых крыс статистически значимых отличий этого показателя у животных, которым вводили экстракты, по сравнению с нормой, не было зафиксировано ни на 14-е, ни на 28-е сутки эксперимента. При введении молодым крысам ЭСцС или ЭСцП на 14-е сутки наблюдения отличия в плотности ядер по сравнению с нормой также были статистически недостоверны ($p > 0,05$). Но на 28-е сутки плотность ядер у животных, которым вводили ЭСцС или ЭСцП, превышала норму на 19 и 20% соответственно, и различия между показателями у экспериментальных животных были статистически достоверными по сравнению с нормой ($p< 0,05$).

Известно, что одноядерные кардиомиоциты сохраняют способность вступать в клеточный цикл, который завершается кариокинезом и цитокинезом. Кариокинез без цитокинеза одноядерных кардиомиоцитов приводит к снижению их процентного содержания и, соответственно, к увеличению числа двуядерных клеток. Поддержка пула одноядерных кардиомиоцитов (репликативного пула) происходит за счет кариокинеза и завершенного цитокинеза. Количественно двуядерные кардиомиоциты преобладают в миокарде крыс и являются не только основными структурно-функциональными элементами миокарда, но и главным компенсаторно-приспособительным резервом миокарда (гипертрофируются при усилении функциональной нагрузки).

В норме ЧСС у 1-месячных крыс составляла 502 ± 27 в 1 минуту, а у 4-месячных – 415 ± 23, и на протяжении эксперимента практически не изменялась в каждой из групп. У опытных животных этот же показатель статистически достоверно не отличался от контроля. Введение животным экстрактов также не влияло на мощность спектра во всех частотных диапазонах, а также на значение стандартного отклонения RR интервалов. Следовательно, введение крысам ЭСцС или ЭСцП не влияет на электрофизиологические показатели функционирования сердца.

При изучении биологического действия экстрактов особого внимания заслуживают данные Л.Э. Весниной [4], которые свидетельствуют, что регуляторное действие пептидов, полученных из различных органов, может быть направлено на лимфоидные клетки. При сравнении биологического действия экстрактов криоконсервированных фрагментов органов при экспериментальных патологиях ранее нами установлено, что ЭСС способствует нормализации исследованных показателей при аллоксановом сахарном диабете, токсическом гепатите, ускоряет процесс заживления термических ран.

Следовательно, действие такого экстракта представляется тканенеспецифическим [5]. Значительная роль в регуляции пролиферации не только иммунных, но и других типов клеток в организме принадлежит лимфоцитам. Экспериментальные данные иммунологии и клеточной биологии показывают, что лимфоцитами, регулирующими пролиферацию, могут быть специализированные Т-клет-

ки стимулирующих и ингибирующих популяций, которые реагируют в сингенной смешанной культуре лимфоцитов на собственные растущие клетки организма [9]. Если принять во внимание тот факт, что экстракт селезенки свиней нормализует иммунный статус организма, в том числе и систему лимфоцитов [3], то можно предположить, что стимуляция регенерации в пораженном органе происходит опосредованно, благодаря нормализации количества и функциональной активности лимфоцитов.

Ниже мы приводим данные относительно влияния экстрактов криоконсервированных фрагментов печени поросят (ЭПП) и свиней (ЭПС) на протекание токсического гепатита (ТГ), а также смеси ЭПП и ЭСС (СЭПС) на протекание цирроза печени (ЦП).

Токсический гепатит вызывали одноразовым введением в брюшную полость крыс 40%-го раствора CCl_4 на вазелиновом масле в дозе 0,4 мл/100 г массы животного. Цирроз печени моделировали введением животным под кожу 40%-го раствора CCl_4 в масле из персиковых косточек в дозе 0,2 мл на 100 г массы тела животных два раза в неделю [1]. Всего выполнено 16 инъекций.

Для оценки процессов свободнорадикального окисления в ячейку хемилюминометра ХЛ-1250, содержащую 1 мл физиологического раствора, добавляли 100 мкл сыворотки крови или 100 мкл гомогената ткани печени и добавляли 100 мкл раствора двухвалентного железа в конечной концентрации 5×10^{-2} моль/л и регистрировали светосумму на протяжении 60 с, которую выражали в условных единицах (усл. ед.). При этом светосумма хемилюминесценции (ХЛ) пропорциональна количеству свободных радикалов, т. е. интенсивности процессов свободнорадикального окисления. Для определения устойчивости ткани к перекисному окислению в ячейку хемилюминометра, содержащую 1 мл физиологического раствора и 100 мкл сыворотки крови или гомогената ткани, добавляли 200 мкл 5%-го раствора перекиси водорода и на протяжении 60 с регистрировали светосумму, которую определяли в усл. ед. Уровень ПОЛ определяли по уровню ТБКАП в сыворотке крови и ткани печени спектрофотометрическим методом по стандартной методике при длине волны 532 нм [2].

Активность АлАТ и АсАТ определяли с использованием стандартных наборов («АО «Реагент», Украина).

Для гистологических исследований ткань печени фиксировали в 10%-м нейтральном формалине с последующей заливкой в парафин. Полученные из парафиновых блоков срезы толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов. Микрогемоциркуляцию в печени изучали методом прижизненной контактной микроскопии с помощью контактного микроскопа «Люмам К-1» («ЛОМО», СССР) [11]. Изображение фиксировали с помощью фотокамеры.

Исследуемые экстракты вводили животным в брюшную полость по 1 мл раз в сутки на протяжении всего эксперимента. Концентрация пептидов в экстрактах составляла 100 мкг/мл.

При поступлении в организм CCl4 расщепляется при участии цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ на свободные радикалы – трихлорметил и хлорил. Вследствие этого активируются процессы ПОЛ в мембранах. Повреждение клеточных мембран является этапом некротического механизма гибели клеток. Этот процесс сопровождается выходом ферментов (АлАТ, АсАТ и др.) в кровь.

Крысы с ТГ были поделены на контрольную (введение физиологического раствора) и две экспериментальные группы – с введением ЭПП или ЭПС. Через 4–5 ч после внутрибрюшинного введения CCl_4 животные становились вялыми, малоподвижными, отмечалась лихорадка. Эти симптомы исчезали через 2-е суток эксперимента у всех животных.

Через сутки после начала введения CCl_4 в сыворотке крови крыс наблюдалось многократное увеличение активности аминотрансфераз, что свидетельствует о значительном повреждении клеток печени (табл. 2). Так, активность АлАТ увеличивалась в 18 раз, а АсАТ – в 5,6 раза по сравнению с нормой. Через 3-е суток после введения CCl_4 активность аминотрансфераз во всех группах уменьшалась по сравнению с первыми сутками, отличия между группами отсутствовали. На 5-е сутки наблюдения активность обеих аминотрансфераз у животных, которым вводили ЭПП, хотя и выше значений, характерных для интактных животных, но достоверно ниже, чем у контрольных. Таким образом, можно сделать вывод, что введение ЭПП способствует уменьшению активности трансаминаз в крови. Эффективность ЭПС в этом плане менее выражена.

Таблица 2. Активность аминотрансфераз в сыворотке крови крыс

Срок после интоксикации, сутки	Группа животных	АлАТ,мкмоль/мл/ч	АсАТ, мкмоль/мл/ч
Норма (0)		0,31 ± 0,02	0,94 ± 0,07
1	ТГ	5,57 ± 0,11	5,24 ± 0,12
3	ТГ	3,52 ± 0,12	3,65 ± 0,13
	ТГ + ЭПП	3,12 ± 0,10	3,08 ± 0,14
	ТГ + ЭПС	3,45 ± 0,13	3,57 ± 0,14
5	ТГ	2,28 ± 0,12	2,75 ± 0,16
	ТГ + ЭПП	1,14 ± 0,09*	1,75 ± 0,07*
	ТГ + ЭПС	2,12 ± 0,12	2,51 ± 0,18

Примечание: * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Концентрация ТБКАП в печени интактных животных составляла 4,4 ± 0,3 нмоль/мг ткани (табл. 3). Введение тетрахлорметана достоверно увеличивало концентрацию ТБКАП в 2,1 раза по сравнению с показателями интактных животных, и она оставалась неизменной у контрольных животных на протяжении 5 суток. У животных, которым вводили ЭПП или ЭПС, этот показатель был достоверно ниже, чем у контрольных крыс, уже на 3-и сутки и еще больше уменьшался на пятые. Отличий между содержанием ТБКАП в печени животных, которым вводили ЭПП или ЭПС, не наблюдалось.

На 1-е сутки после введения животным CCl_4 светосумма индуцируемой Fe^{2+} ХЛ ткани печени превышала норму в 5,5 раза, на 3-и сутки почти в 11 раз и оставалась таковой до 5-х суток. Аналогичная тенденция наблюдалась также у светосуммы ХЛ, индуци-

Таблица 3. Показатели ПОЛ в печени крыс

Срок после интоксикации, сутки	Группа животных	ТБКАП, нмоль/мг ткани	Светосумма ХЛ, индуцированной Fe^{2+}, усл. ед.	Светосумма ХЛ, индуцированной H_2O_2, усл. ед.
Норма (0)		4,2 ± 0,3	67 ± 5	481 ± 42
1	ТГ	8,7 ± 0,6	378 ± 31	2275 ± 213
3	ТГ	9,1 ± 0,5	721 ± 73	3118 ± 289
	ТГ + ЭПП	7,0 ± 0,3*	601 ± 57	2738 ± 253
	ТГ + ЭПС	7,1 ± 0,3*	668 ± 59	2475 ± 225
5	ТГ	9,8 ± 0,7	772 ± 72	3525 ± 324
	ТГ + ЭПП	6,1 ± 0,4*	127 ± 9*	1109 ± 103*
	ТГ + ЭПС	5,8 ± 0,3*	149 ± 12*	1327 ± 119*

Примечание: * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

руемой H_2O_2. Но в этом случае превышение было менее выражено. На 5-е сутки эксперимента оба показателя были значительно ниже контроля в обеих группах животных. Таким образом, и ЭПС, и ЭПП эффективно уменьшают уровень свободных радикалов и интенсивность ПОЛ в печени при токсическом гепатите.

Относительно высокий уровень ТБКАП в сыворотке крови животных может быть частично связан с выходом продуктов ПОЛ в кровяное русло из пораженной печени (табл. 4). На 3-и сутки светосумма превышала норму в 7 и 9,3 раза для ХЛ, индуцируемой двухвалентным железом и перекисью водорода соответственно. В этот же срок наблюдения исследованные показатели у животных, которым вводили ЭПП или ЭПС, становятся достоверно меньше, чем у животных с ТГ, которых не лечили. На 5-е сутки у крыс с ТГ как уровень ТБКАП, так и светосумма ХЛ остаются

Таблица 4. Показатели ПОЛ в сыворотке крови крыс

Срок после интоксикации, сутки	Группа животных	ТБКАП, нмоль/мг ткани	Светосумма ХЛ, индуцированной Fe^{2+}, усл. ед.	Светосумма ХЛ, индуцированной H_2O_2, усл. ед.
Норма (0)		3,4 ± 0,1	135 ± 11	609 ± 54
1	ТГ	6,8 ± 0,4	692 ± 59	3948 ± 327
3	ТГ	7,2 ± 0,3	997 ± 89	5638 ± 526
	ТГ + ЭПП	5,4 ± 0,3*	423 ± 37*	2231 ± 113*
	ТГ + ЭПС	5,4 ± 0,2*	492 ± 42*	2485 ± 18*
5	ТГ	7,3 ± 0,4	548 ± 51	3127 ± 291
	ТГ + ЭПП	4,3 ± 0,3*	241 ± 19*	987 ± 73*
	ТГ + ЭПС	4,4 ± 0,3*	291 ± 26*	1036 ± 89*

Примечание: * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

практически неизменными по сравнению с 1-и сутками. При введении экстрактов наблюдается их значительное уменьшение. Так, уровень ТБКАП превышает норму в 1,3 раза при введении как ЭПП, так и ЭПС. Светосумма ХЛ, индуцированная двухвалентным железом, превышает норму в 1,8 и 2,2 раза при введении ЭПП и ЭПС соответственно, а светосумма ХЛ, индуцированная перекисью водорода, в 1,6 и 1,7 раза при тех же условиях.

Следовательно, уменьшение уровня ХЛ в сыворотке крови начинается в более ранние сроки, чем в печени, и выражено в большей мере. Это, возможно, связано с тем, что активация ПОЛ в крови при отравлении CCl_4 является вторичным процессом по отношению к активности ПОЛ в печени, где CCl_4 метаболизируется с образованием свободных радикалов.

При гистологическом исследовании печени спустя сутки после введения CCl_4 наблюдалась пассивная круглоклеточная инфильтрация паренхимы с вакуолизированными ядрами, но общая архитектоника печени была не изменена по сравнению с тканью печени интактного животного (норма), т. е. сохранялись регулярное трабекулярное строение паренхимы печени и правильная организация капилляров синусоидного типа.

На 3-и сутки после отравления CCl_4 в печени животных, которые не получали лечения, видно формирование ложных долек. Структура печени у животных, которым вводили ЭПС, практически ничем не отличалась от структуры печени крыс с ТГ, тогда как на срезе печени, сделанном после введения ЭПП, отсутствуют признаки некроза ткани, которые наблюдаются в контроле.

На 5-е сутки эксперимента выявлены нарушение архитектоники печени и распространение центролобулярного некроза. После введения ЭПС на фоне ТГ на 5-е сутки некроз был менее выражен, хотя и наблюдались явления жировой дистрофии гепатоцитов. После введения ЭПП на фоне ТГ архитектоника печени не изменена и соответствует норме. Количество гепатоцитов увеличено как у животных, которым вводили ЭПП, так и у тех, которые получали ЭПС, по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, было установлено, что при введении ЭПП крысам с ТГ на 5-е сутки наблюдалось достоверное уменьшение активности аминотрансфераз в крови опытных животных по сравнению с крысами, у которых ТГ не лечили. Концентрация ТБКАП в печени крыс при введении как ЭПП, так и ЭПС, достоверно меньше, чем у контрольных животных уже на 3-и сутки. Этот показатель продолжал уменьшаться до 5-х суток наблюдения. Интенсивность ХЛ на 5-е сутки при введении экстрактов была значительно меньше, чем в контроле, хотя и выше нормы, а интенсивность ПОЛ в сыворотке крови – меньше, чем в печени. Уровень ХЛ в сыворотке крови на фоне введения экстрактов начинает снижаться раньше, чем в печени, и оно выражено в большей мере. Таким образом, исследованные экстракты стимулируют репаративные процессы в печени при ТГ, что проявляется морфологически в нормализации ее структуры. Так, у животных с ТГ на 5-е сутки наблюдаются нарушение архитектоники печени и распро-

странение центролобулярного некроза. При введении животным ЭПП или ЭПС уменьшается выраженность некроза, хотя и отмечаются явления жировой дистрофии гепатоцитов. При этом наблюдается увеличение количества гепатоцитов при введении экстрактов.

Биологическое действие смеси экстрактов печени и селезенки (СЭПС) изучали на животных с экспериментальным циррозом печени (ЦП), который подтверждался биохимическими показателями крови и результатами гистологического анализа, также наблюдались асцит, увеличение печени и селезенки, изменение цвета и плотности органа.

Через 3-е суток после начала внутрибрюшинного введения животным с циррозом печени СЭПС у животных экспериментальной группы печень макроскопически не отличалась от печени животных контрольной группы. Однако во время прижизненной биомикроскопии микроциркуляторного русла наблюдалось заметное увеличение количества функционирующих синусоидов. Относительная площадь сосудистого русла печени животных экспериментальной группы составляла (35,2 ± 3,2)% , а контрольной – 27,3 ± 2,9%. Диа-метры сосудов при этом не изменялись.

На 14-е сутки печень животных экспериментальной группы была более эластичной, чем контрольной. Наблюдалось небольшое количество асцитной жидкости в брюшной полости. Микроциркуляторное русло характеризовалось увеличением площади сосудов, кровоток быстрый, струйный, агрегация эритроцитов отсутствовала. Параметры микрогемоциркуляторного русла, измеренные при биомикроскопическом исследовании, представлены в табл. 5.

При гистологическом исследовании печени животных контрольной группы на 14-е сутки эксперимента определялись различные по размерам узлы регенерировавшей паренхимы печени. Балочное строение долек не определялось. Сильно развита фиброзная ткань, наличие фиброцитов и фибробластов свидетельствовало о процессе фиброзообразования. Признаки портальной гипертензии проявляются в виде венозного застоя, дилатации центральных вен, гемосидероза, расширения артерий портальных трактов. Микроскопическое исследование препаратов печени животных экспери-

Таблица 5. Параметры микроциркуляторного русла печени крыс на 14-е сутки эксперимента

Параметры	Интактные животные	Контрольная группа	Экспериментальная группа
Средний диаметр синусоидов, мкм	9,28 ± 2,18	7,67 ± 0,84	8,91 ± 2,01
Площадь микрососудов относительно площади печени в поле зрения	0,53 ± 0,02	0,27 ± 0,03*	0,52 ± 0,02

Примечание: * – отличие статистически достоверно по сравнению с показателями интактных животных, $p < 0,05$.

ментальной группы показало, что к этому сроку формируется мелкоузловой ЦП. Узлы регенерирующей паренхимы печени не имеют нормальной дольковой структуры и окружены соединительной (фиброзной) тканью.

Контактная прижизненная микроскопия печени животных экспериментальной группы показала значительное увеличение количества функционирующих микрососудов печени по сравнению с контрольной группой. У животных экспериментальной группы бессосудистые участки практически отсутствуют, желчные капилляры образуют сеть, близкую к нормальной.

К 30-м суткам эксперимента в препаратах печени животных контрольной группы обнаруживаются морфологические изменения, характерные для ЦП, вызванного тетрахлорметаном. Цирротический процесс стабилизируется, что подтверждается преобладанием фиброцитов в соединительной ткани, образующей ложные дольки. Синусоиды, артерии и вены остаются дилатированными. При этом отсутствует правильная организация синусоидов. В пределах пограничной пластинки обнаруживается склероз портальных трактов печени. Признаки портальной гипертензии проявляются в виде венозного застоя и отложений в соединительной ткани гемосидерина как результата выхода в ткань эритроцитов при диапедезных кровоизлияниях.

На 30-е сутки эксперимента в препаратах печени животных экспериментальной группы обнаруживается истончение фиброзной ткани вокруг островков регенерировавшей паренхимы и в портальных трактах. В узлах-регенератах с центральной веной видно, как гепатоциты начинают выстраиваться радиально, образуя балочный рисунок. Однако местами в гепатоцитах наблюдается баллонная и гидропическая дистрофия. Признаки жировой дистрофии обнаружены в единичных клетках, расположенных вблизи центральных вен. Диаметр артерий портальных трактов нормализуется. Синусоиды к этому сроку, как и у животных контрольной группы, обычного размера, местами восстановлена их правильная организация. Липоциты в перисинусоидальных пространствах не обнаруживаются.

Результаты исследования биохимических показателей в сыворотке крови крыс с ЦП после введения СЭПС представлены в табл. 6. На 3-и сутки наблюдения уровень альбумина достоверно превышал аналогичные показатели в контрольной группе. Активность АлАТ и АсАТ у животных всех групп была более чем в 4 раза выше нормы на протяжении первых 3-х суток наблюдений ($p < 0,001$).

В конце 1-й недели эксперимента активность АлАТ сохранялась у животных контрольной группы на этом же уровне, а в экспериментальной группе она несколько снижалась. У животных экспериментальной группы первоначальный четырехкратный подъем активности АлАТ к концу 1-й недели наблюдений был выше нормы в 3,5 раза, а на 14-е сутки – в 2 раза ($p < 0,05$).

К 30-м суткам наблюдений у животных, которых не лечили, сохранялась умеренно повышенная активность АлАТ (в 1,5 раза выше нормы, $p<0,05$). В экспериментальной группе уровень активности фермента восстанавливался до нормы, причем он был достоверно ниже такового у животных с циррозом печени.

Динамика активности АсАТ была аналогична вышеописанной динамике АлАТ, хотя уровень активности был ниже. К 30-м суткам, т.е. к концу периода наблюдений, повышенный уровень активности АсАТ у животных с ЦП сохранялся (на 68% выше нормы, $p<0,05$), а в экспериментальной группе показатель не отличался от нормы и был достоверно ниже такового у животных с циррозом.

Таблица 6. Биохимические показатели сыворотки крови крыс с экспериментальным циррозом печени

Показатели		Сроки наблюдения, сутки			
		3-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	30-е сутки
Концентрация альбумина, мг/мл и % от нормы	К	25,6 ± 2,0[1] 61,7%	25,6 ± 1,5[1] 61,8%	25,9 ± 1,3[1] 62,55%	27,2 ± 1,6[1] 65,5%
	Э	26,1 ± 1,1[1] 62,9%	28,3 ± 1,2[1] 68,2%	27,8 ± 1,1[1] 67,0%	35,6 ± 1,4[1,2] 85,8%
Активность АлАТ, ммоль/мл/ч и % от нормы	К	1,65 ± 0,31[1] 446%	1,53 ± 0,22[1] 413%	1,33 ± 0,11[1] 359%	0,58 ± 0,08[1] 157%
	Э	1,63 ± 0,13[1] 440.5%	1,32 ± 0,18[1] 357%	0,74 ± 0,07[1] 200%	0,39 ± 0,04[2] 105%
Активность АсАТ, ммоль/мл/ч и % от нормы	К	1,88 ± 0,20[1] 213%	1,68 ± 0,12[1] 191%	1,62 ± 0,11[1] 184%	1,48 ± 0,09[1] 168%
	Э	1,72 ± 0,12[1] 195%	1,48 ± 0,13[1] 168%	1,12 ± 0,07[1] 127%	0,91 ± 0,04[2] 103%
Уровень ТБКАП, нмоль/мл и % от нормы	К	8,86 ± 1,01[1] 250%	8,52 ± 0,85[1] 240%	7,75 ± 0,65[1] 218%	5,43 ± 0,41[1] 153%
	Э	8,69 ± 1,08[1] 245%	6,87 ± 0,74[1] 193%	5,34 ± 0,44[1,2] 150%	4,15 ± 0,28[2] 117%
Уровень общего билирубина, мкмоль/л и % от нормы	К	16,05 ± 1,35[1] 195%	15,74 ± 0,78[1] 191%	13,95 ± 1,1[1] 170%	9,68 ± 0,85 118%
	Э	15,56 ± 1,03[1] 189%	12,54 ± 0,87[1] 152%	10,15 ± 0,76[2] 124%	8,64 ± 0,61 105%

Примечания: К – контрольная; Э – экспериментальная группа; концентрация альбумина в норме составляет 41,5 ± 1,7 мг/мл; активность АлАТ в норме – 0,37 ± 0,04 ммоль/мл/ч; активность АсАТ в норме – 0,88 ± 0,07 ммоль/мл/ч; уровень ТБКАП в норме – 3,55 ± 0,17 нмоль/мл; уровень общего билирубина в норме – 8,21 ± 0,54 мкмоль/л. Различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с показателями: [1] – интактных крыс; [2] – с циррозом печени.

Нормализация уровня печеночных аминотрансфераз через 14–30 суток после воздействия у животных с циррозом, получавших экстракты, свидетельствует об их позитивном влиянии на внутриклеточные репаративные процессы в гепатоцитах.

Общепризнано, что любые деструктивные процессы в организме сопровождаются повышением уровня свободнорадикальных процессов в тканях и выбросом продуктов ПОЛ в кровь.

Полученные данные показывают, что в первые трое суток после начала эксперимента уровень ТБКАП в сыворотке крови был выше нормы в 2,5 раза в обеих группах животных ($p < 0,001$). На 7-е сутки наблюдений в группе животных с циррозом печени, которых не лечили, сохранялся высокий уровень активации ПОЛ – в 2,4 раза больше нормы, а у крыс, получавших экстракты, превышение нормальных показателей составляло 1,9 раза. На 14-е сутки наблюдения у животных контрольной группы еще сохранялся довольно высокий уровень продуктов ПОЛ в сыворотке крови (превышение нормы в 2,2 раза), у животных экспериментальной группы превышение составляло только 1,5 раза, что было достоверно ниже показателей контроля.

На 30-е сутки наблюдений повышенный уровень ТБКАП в сыворотке крови был только у животных с ЦП, в экспериментальной группе активность ПОЛ восстанавливалась до нормы.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что введение экстрактов оказывает выраженный антиоксидантный эффект.

Из представленных в табл. 6 данных видно, что уровень билирубина в сыворотке крови крыс с экспериментальным циррозом повышался примерно в 2 раза по сравнению с нормальным и сохранялся на этом уровне первую неделю наблюдений. В экспериментальной группе животных двукратно повышенный уровень билирубина отмечался только на 3-и сутки.

На 14-е сутки нормальный уровень билирубина восстанавливался у животных, получавших экстракты, причем этот показатель был достоверно ниже, чем у животных с ЦП, которых не лечили. Хотя экскреторная функция печени восстанавливалась за определенный период и у животных с циррозом, которых не лечили,

применение экстрактов увеличивало скорость восстановления этой важнейшей функции печени.

Исследования продемонстрировали эффективность применения экстрактов криоконсервированных фрагментов печени и селезенки при лечении экспериментального цирроза. Применение экстрактов печени и селезенки стимулирует восстановление микрогемоциркуляторного русла, гистологического строения поврежденного органа и способствует уменьшению фиброза печени крыс с экспериментальным циррозом. При этом восстанавливаются и функции гепатоцитов, о чем свидетельствуют биохимические показатели сыворотки крови.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой биологической активности экстрактов криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят на различных моделях патологических состояний. В дальнейшем предполагается изучить влияние ЭСС, ЭСцС и ЭСцП на развитие некроза миокарда и последующее ремоделирование сердца.

Литература

1. Абдулаев Н.Х., Каримов Х.Я. Печень при интоксикациях гепатотропными ядами. – М.: Медицина, 1989. – 96 с.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рекомендации. – СПб.: ИКФ Фолиант, 2000. – С. 46–50.
3. Бызов В.В., Высеканцев И.П., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких // Проблемы криобиологии. – 2001. – №4. – С. 65–70.
4. Веснина Л.Э. Эффект ремодуляции поверхностных рецепторов лимфоцитов пептидным комплексом почек // Архив клин. и эксперим. мед. – 2000. – Т. 9, №3. – С. 353–355.
5. Гальченко С.Є., Бєлочкіна І.В., Тининика Л.М., Сандомирський Б.П. Порівняльне вивчення біологічної дії екстрактів кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів // Проблеми мед. науки та освіти. – 2006. – №1. – С. 67–69.
6. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 403–406.
7. Гальченко С.Є. Рівень перекисного окислення ліпідів у щурів різного віку після дії ксеноекстрактів // Проблеми мед. науки та освіти. – 2005. – №3. – С. 47–48, 56.
8. Гальченко С.Є. Тканинна та вікова специфічність водно-сольових екстрактів кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №2. – С. 153–158.
9. Донцов В.И. Иммунобиология постнатального развития. – М.: Наука, – 1990. – 151 с.
10. Ролик И.С. Основы клинической фармакологии органопрепаратов. Руководство.–М.: РегБиоМед. – 2004. – 336 с.

11. Слета И.В. Реакция микроциркуляции печени на низкотемпературное воздействие // Проблемы криобиологии. – 2002. – №3. – С. 89–91.
12. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Чалисова Н.И, Григорьев Е.И. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста // Успехи геронтологии. – 2002. – Вып. 9. – С. 278–285.
13. Яцкин О.Н., Карелин А. А., Иванов В.Т. Пептидомы мозга, сердца легких и селезенки крысы: сходство и различие // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35, №4. – С. 471–482.
14. Пат. 13543 Україна МПК5 А61К35/26. Спосіб одержання лікарської форми препарату «Вілозен» з вилочкової залози / Ю.В. Волощенко, І.А. Безвершенко, І.М. Гавриш; заявник і патентовласник Київське підприємство по виробництву бактерійних препаратів «Біофарма». – №4440021/ SU; заявлено 03.05.88; опубл. 25.04.97, Бюл. №2.
15. Пат. 64381 А Україна, МПК7 А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко; заявник і патентовласник ІПКіК НАН України. – №2003054649; заявлено 22.05.2003; опубл. 16.02.2004, Бюл. №2.
16. Christopher J.C., Timothy C.R.P., Eric A. Regional sampling and the effects of experimental heart failure in sheep: Differential responses in A, B and C-type natriuretic peptides // Peptides.– 2006.–№27.–P. 62–68.
17. Engel F.B., Schebesta M., Duong M.T. et al. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes // Genes Dev. –2005. – Vol. 19, №10. – P. 1175–1187.
18. Kosevich M.V., Osaulenko V.L., Chagovets V.V. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric study of bisquaternary ammonium antimicrobial agent decamethoxinum in 2,5–dihydroxybenzoic // Масс-спектрометрия. – 2005. – №2(3). – С. 183–192.
19. Rasi G., Pirimarchi D., Virgilio F. et al. Thymosine α in viral hepatitis treatment // Intern. J. Immunorehabil. – 2001. – Vol. 1, №2. – P. 41–43.

Эффективность клеточной терапии в лечении гемофтальма

Ю.А. Дёмин[1]*, Т.Н. Юрченко[2],
Т.М. Шарлай[2], М.Ю. Дёмина[1]

[1]Кафедра офтальмологии
Харьковская медицинская академия последипломного образования
ул. Корчагинцев 58; г. Харьков, Украина 61176
**электронная почта: girsh@ukr.net*
[2]Отдел криоморфологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ул. Переяславская, 23; г. Харьков, Украина 61015

В последние десятилетия интенсивно развивается новое направление в медицине – клеточная терапия, использующая криоконсервированные клетки и ткани эмбриофетоплацентарного комплекса.

Суть метода клеточной терапии заключается в активации компенсаторных ресурсов поврежденных клеток и тканей реципиента, стимуляции механизмов регенерации, замещении утраченных клеточных и тканевых структур с последующим восстановлением функций органа, ткани [9, 15, 24].

Однако до сих пор не существует терапевтического средства и схемы введения, которые полностью решили бы вопросы патогенетического лечения травматического гемофтальма [4, 11, 13, 19]. С нашей точки зрения, перспективным для патогенетического лечения гемофтальма является препарат криоконсервированных клеток эмбриональной печени (ККЭП), разработанный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [8].

Гемофтальм – одно из частых и тяжелых осложнений травм органа зрения. Изучению патогенеза внутриглазных кровоизлияний

Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 739–763.
© Ю.А. Дёмин, Т.Н. Юрченко, Т.М. Шарлай, М.Ю. Дёмина, 2012

Используемые сокращения
ККЭП – криоконсервированные клетки эмбриональной печени
ИК – индекс коагуляции
КФ – кислая фосфатаза

посвящены многочисленные исследования. Несмотря на некоторые разногласия по отдельным вопросам, общепризнанными при рассасывании крови в стекловидном теле принято выделять три основных звена: гемолиз, фибринолиз, фагозитоз. В этой связи рационально назначение медикаментозных препаратов, воздействующих именно на эти звенья патогенеза [1].

На основании проведенного экспериментального исследования и клинической апробации доказано, что ККЭП и препарат «Гемонейронал» обладают высокой жизнеспособностью, поскольку в них сохранены основные фенотипические свойства [7, 10, 12, 22]

Нами изучено влияние ККЭП на состояние коагуляционного и фибринолитического звеньев системы гемостаза при экспериментальном травматическом гемофтальме.

Состояние свертывающей системы крови у экспериментальных животных изучали методом электрокоагулографии.

Представленные в табл. 1 данные показывают, что у животных с экспериментальным гемофтальмом на 3-и сутки после нанесения травмы отмечено резкое повышение свертывающей активности крови, причем за счет уменьшения длительности всех трех фаз. Так, продолжительность I–II фаз сократилась более чем в два раза (45% от исходного уровня). Продолжительность III фазы была еще короче (37,9% от исходного уровня). В результате этого индекс коагуляции (ИК) был в два раза ниже нормы (41,2% от исходного уровня), что свидетельствует о выраженном гиперкоагуляционном сдвиге.

На 7-е сутки после травмы у животных без лечения подобная картина сохранялась практически полностью. Суммарный индекс коагуляции был достоверно меньше такового в норме (65,6% от исходного уровня). Однако можно отметить некоторую тенденцию к его повышению по сравнению с аналогичными показателями на 3-и сутки. Следовательно, у кроликов без лечения гиперкоагуляционный сдвиг в системе гемостаза сохранялся на протяжении 7 суток после травмы.

Таблица 1. Воздействие ККЭП на коагуляционное звено гемостаза при экспериментальном травматическом гемофтальме по показателям электрокоагулограммы

Срок наблюдения	Показатели травматического экспериментального гемофтальма					
	T1, мин	T2, мин	T3, мин	Am, усл.ед.	Ao, усл.ед.	ИК, усл.ед.
Исходный уровень	4,0±0,21	9,8±0,36	5,8±0,23	40±0,01	1,0±0,02	5,1±0,19
3 суток без ККЭП (n=7)	1,8±0,29[1,2]	4,00±0,11[1,2]	2,20±0,37[1,2]	42±0,02	1,0±0,01	2,1±0,07[1,2]
7 суток без ККЭП (n=7)	2,0±0,09[1,2]	4,67±0,44[1,2]	2,67±0,75[1,2]	42±0,01	1,0±0,01	3,34±0,13[1,2]
14 суток без ККЭП (n=7)	3,8±0,16[2]	9,2±0,39	5,4±0,19	38±0,02	1,0±0,01	4,78±0,21
3 суток с ККЭП (n=7)	4,17±0,11	7,83±0,09	3,67±0,14[1]	37±0,02	1,0±0,01	4,08±0,34[1]
7 суток с ККЭП (n=7)	4,0±0,07	12,0±0,34[1]	8,0±0,73	42±0,01	1,0±0,01	6,24±0,18[1]

Примечания: [1] – различия достоверны по отношению к показателям исходного уровня ($p < 0,05$); [2] – различия достоверны по отношению к показателям животных, которым вводили ККЭП ($p < 0,05$).

Через 14 суток все показатели электрокоагулограммы нормализовались, в результате суммарный индекс коагуляции практически достиг нормы (93,7% от исходного уровня). Отмеченная на 7-е сутки тенденция к ослаблению гиперкоагуляционного сдвига полностью проявилась только на 14-е сутки.

При введении ККЭП кроликам с гемофтальмом уже на 3-и сутки после нанесения травмы отмечено выраженное положительное воздействие на свертывающую систему крови: I и II фазы имели нормальную продолжительность, только III фаза была заметно сокращена (63,4% от исходного уровня). Суммарный индекс коагуляции был несколько ниже нормы (80%).

На 7-е сутки показатели электрокоагулограммы у животных, которым вводили ККЭП, почти соответствовали исходным. Следует отметить, что и в этот период отмечалась нестабильность III фазы свертывания крови, однако наблюдался сдвиг в сторону гипокоагуляции: показатель Т3 превышал исходный на 37,9%, что влияло на повышение суммарного индекса коагуляции (122% от исходного уровня).

На 14-е сутки наблюдений все показатели электрокоагулограммы у животных, которым вводили ККЭП, полностью соответствовали нормальным.

Таким образом, системная гиперкоагуляционная реакция организма на травму у животных с гемофтальмом полностью исчезала к 14-м суткам, а у животных, получавших ККЭП, подобная реакция исчезала уже к 7-м суткам.

Известно, что повышение активности свертывающей системы крови неизбежно повышает активность противосвертывающей, то есть фибринолиза. В большинстве клинических случаев активация фибринолиза вторична и связана либо с диссеминированным свертыванием крови, либо с массивными тромбоэмболиями, а также с интенсивной локальной гемокоагуляцией в органах, в том числе при травмах [14].

В соответствии с классическими представлениями эффекторный акт противосвертывающей системы крови заключается в поступлении в циркуляторное русло из тканевых депо активаторов плазминогена и гепарина. Активация плазминогена (фибринолизина) является ферментативным звеном в процессе фибринолиза, а гепарин и его комплексные соединения считаются неферментативным звеном этого процесса. Их совместная активность дает в результате суммарную фибринолитическую активность, которая изучалась в настоящей работе. Данные о состоянии фибринолитической активности крови при экспериментальном гемофтальме и его лечении ККЭП представлены в табл. 2.

У животных с экспериментальным гемофтальмом на 3-и сутки после травмы показатели суммарной и неферментативной фибринолитической активности были снижены в среднем на 40% по сравнению с исходными, что свидетельствует об угнетении противо-

свертывающей активности. Это препятствует активному рассасыванию локального кровоизлияния в травмированном глазу в ранний период его заживления.

На 7-е сутки наблюдений показатели фибринолитической активности несколько повышались (77–72% от исходного уровня, $p < 0,05$), однако полного восстановления активности не отмечено. К 14-м суткам после травмы активность системного фибринолиза полностью восстанавливалась. В этот же период клинически отмечалось постепенное рассасывание кровоизлияния.

В группе животных с гемофтальмом при введении ККЭП на 3-и сутки после травмы фибринолитическая активность крови была несколько угнетена, о чем свидетельствовали показатели как суммарной, так и неферментативной фибринолитической активности (79–74% от исходного уровня). Однако в ранний период эти значения были на 18–15% выше, чем в группе животных без лечения ($p < 0,05$).

Таблица 2. Воздействие ККЭП на показатели фибринолитической активности крови при экспериментальном травматическом гемофтальме

Срок наблюдения	Фибринолитическая активность, усл.ед.			
	без введения ККЭП (n = 6)		введение ККЭП (n = 6)	
	суммарная	неферментативная	суммарная	неферментативная
Исходный уровень (n = 12)	38,2 ± 0,7	18,8 ± 1,13	–	–
3 суток	23,4 ± 1,36*#	11,2 ± 0,84*#	30,3 ± 0,48*	14,0 ± 0,33*
7 суток	29,4 ± 1,17*#	13,6 ± 0,28*#	49,8 ± 1,46 *	16,8 ± 1,26
14 суток	36,1 ± 1,25#	18,6 ± 2,11	41,7 ± 0,19	19,9 ± 1,18

Примечания:* – различия достоверны по отношению к показателям исходного уровня ($p < 0,05$); # – различия достоверны по отношению к показателям после лечения ($p < 0,05$).

На 7-е сутки после травмы и введения ККЭП у животных отмечали восстановление активности неферментативного звена фибринолиза и активация (на 28% выше исходных значений) суммарной фибринолитической активности. Это свидетельствует об активации именно ферментативного звена фибринолиза.

На 14-е сутки у экспериментальных животных после лечения ККЭП наблюдалась нормализация всех звеньев противосвертывающей системы.

Следует отметить, что на 7-е сутки небольшой гипокоагуляционный сдвиг и повышение активности фибринолиза, очевидно, адекватны клинической ситуации и не угрожают повторными кровоизлияниями, о чем свидетельствовали как клинические наблюдения, так и полная нормализация системы гемостаза у животных после введения ККЭП к 14-м суткам. Эти данные хорошо согласуются с офтальмоскопическими наблюдениями, согласно которым наиболее активный этап рассасывания кровоизлияния приходится на 4–5-е сутки после нанесения травмы и проведенного лечения.

Полученные в работе клинические и лабораторные результаты относительно состояния системы гемостаза свидетельствуют о фибринолитическом действии ККЭП.

Кроме того, мы исследовали влияние ККЭП на активность лизосомальных ферментов в тканях глаза при экспериментальном травматическом гемофтальме.

Основной задачей на данном этапе исследования было выявление ферментативной активности лизосомального происхождения в травмированном стекловидном теле глаза экспериментальных животных. С этой целью определяли активность маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы (КФ) в течение 14 суток после травмы и начала лечения. Полученные данные об активности КФ представлены в табл. 3.

Установлено, что в травмированном стекловидном теле глаза появляется выраженная лизосомальная активность. Следует учитывать, что в здоровом стекловидном теле глаза активность КФ не определяется. Источником КФ в травмированной ткани глаза являются эритроциты, которые содержат большое количество

этого фермента [17]. По мере гемолиза эритроцитов (7-е сутки) содержание фермента увеличивается и к 14-м суткам уже в два раза превышает его содержание на 3-и сутки.

Однако эритроциты не могут быть единственным источником КФ столь длительное время, так как к 14-м суткам отмечаются уже остаточные явления гемофтальма и формируется помутнение стекловидного тела глаза. Известно, что одновременно с гемолизом эритроцитов происходит их фагоцитоз при участии гематогенных макрофагов, которым принадлежит важная роль в рассасывании интравитреальных геморрагий [6]. Макрофаги содержат большое количество лизосомальных ферментов, в том числе КФ [23].

Введение ККЭП резко повышало гидролитическую активность в травмированном стекловидном теле глаза – активность КФ в 7,6 раза превышала показатель в контрольной группе на 3-и сутки. Динамика активности фермента в опытной группе аналогична контрольной группе, то есть происходило постепенное нарастание активности фермента с 3-х до 14-х суток. Однако, если средние данные представить в процентах к контрольным, принятым за 100%, то можно отметить, напротив, постепенное уменьшение разницы между опытными и контрольными показателями. Так,

Таблица 3. Воздействие ККЭП на активность КФ в стекловидном теле глаза кролика при травматическом гемофтальме (мкг $P_н$/г ткани за 1 мин)

Группа	Срок наблюдения, сутки		
	3	7	14
Контрольная (n = 15)	0,852 ± 0,11	0,966 ± 0,20	1,761 ± 1,24
Основная (n = 17)	6,52 ± 1,50*	6,61 ± 1,13*	7,32 ± 1,85*

Примечание: * – различия достоверны по отношению к показателям контрольной группы ($p < 0,05$).

если на 3-и сутки активность КФ у животных опытной группы превышала контрольные значения в 7,6 раза, то на 14-е сутки только в 4,1 раза. С одной стороны, это свидетельствует о стабильности и высокой ферментативной активности клеток эмбриональной печени и объясняет один из механизмов их рассасывающего действия. С другой стороны, в опытной группе, хотя и со значительным запаздыванием, также усиливается поставка ферментов, очевидно, за счет усиления индукции дифференцировки макрофагов из моноцитов крови в месте травматического повреждения [23]. Итак, результаты эксперимента показывают, что введение ККЭП резко повышает ферментативную лизосомальную активность в стекловидном теле глаза при травматическом гемофтальме, что, несомненно, способствует активному лизису сгустка.

Таким образом, при определении активности маркерного лизосомального фермента установлено: во-первых, появление лизосомальной ферментативной активности в травмированном стекловидном теле глаза при гемофтальме, которая является одним из механизмов рассасывания интравитреального кровоизлияния; во-вторых, значительное усиление этого механизма при введении ККЭП.

Известно, что функцией КФ является разрушение фосфорных эфиров, а в данном участке глаза – лизис гемоглобина, фибрина и других белков крови. Полноценное рассасывание гемоглобина – важнейшее условие ликвидации как самого гемофтальма, так и его последствий. Показано, что поражение сетчатки при гемофтальме обусловлено железосодержащими продуктами и при этом появляются клинические признаки гемосидероза. Токсическое действие гемоглобина способно вызывать дегенерацию сетчатки [11].

Основным тканевым протеолитическим ферментом, разрушающим гемоглобин, является лизосомальная протеаза – катепсин Д. Поэтому следующей задачей настоящей работы было определение активности катепсина Д в тканях глаза при травматическом гемофтальме и его лечении ККЭП.

Активность катепсина Д определяли в стекловидном теле и сосудистой оболочке глаза кроликов. Для исследования использовали ткани интактного и травмированного глаза (табл. 4, 5).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии активности катепсина Д в тканях как травмированного, так интактного («здорового») глаза экспериментальных животных (табл. 4). Следует учитывать, что активность лизосомальных ферментов, в том числе и катепсина Д, в стекловидном теле глаза у интактных животных не определяется.

В контрольной группе животных (без лечения) наивысшая активность изучаемого фермента в стекловидном теле интактного глаза отмечалась на 7-е сутки (1,77 нмоль/мг). На 14-е сутки спонтанного рассасывания кровоизлияния данная системная реакция резко ослабевала (снижение активности фермента более чем в три раза), а к 21-м суткам еще сохранялась выраженная ферментативная активность, свидетельствующая о длительности системной реакции при травматическом гемофтальме.

В стекловидном теле травмированного глаза активность изучаемого фермента была в 2–4 раза выше, чем в интактном на протяжении всего периода наблюдений. Можно отметить тенден-

Таблица 4. Воздействие ККЭП на активность катепсина Д в стекловидном теле глаза при экспериментальном травматическом гемофтальме (нмоль тирозина/мг ткани/ч)

Группа	Объект наблюдения	Срок наблюдения, сутки		
		7	14	21
Контрольная (n = 16)	Интактный глаз	1,77 ± 0,03	| 0,54 ± 0,31	1,04 ± 0,09
	Гемофтальм	2,43 ± 0,05	2,17 ± 0,34	3,94 ± 0,08*
Основная (n = 18)	Интактный глаз	1,10 ± 0,17*	1,31 ± 0,02*	1,24 ± 0,14
	Гемофтальм	5,64 ± 0,13*	4,85 ± 0,47*	3,94 ± 0,08*

Примечание: * – различия достоверны по отношению к показателям контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 5. Воздействие ККЭП на активность катепсина Д в сосудистой оболочке глаза при экспериментальном травматическом гемофтальме (нмоль тирозина/мг ткани/ч)

Группа	Объект наблюдения	Срок наблюдения, сутки		
		7	14	21
Норма	Глаз	7,495 ± 0,56		
Контрольная (n = 16)	Интактный глаз	6,31 ± 0,58	9,25 ± 0,21*	7,1 ± 0,37
	Гемофтальм	38,22 ± 1,34*	19,25 ± 0,65*	15,8 ± 0,87*
Основная (n = 18)	Интактный глаз	9,43 ± 1,1	13,97 ± 0,43*	10,2 ± 0,28*
	Гемофтальм	31,3 ± 0,78*	34,71 ± 1,14*	53,20 ± 1,23*

Примечание: * – различия достоверны по отношению к показателям нормы ($p < 0,05$).

цию к повышению активности фермента в течение 21-х суток наблюдения (примерно в 1,2 раза).

При лечении экспериментального гемофтальма введением ККЭП в стекловидном теле глаза подопытных кроликов наблюдалась несколько иная картина. Так, в интактном стекловидном теле глаза у животных после лечения отмечалась стабильно выраженная системная реакция. Значения катепсина Д были зафиксированы на уровне 1–1,3 нмоль/мг/ч.

При сравнении показателей активности катепсина Д в интактном стекловидном теле глаза у кроликов опытной и контрольной групп (средние данные в опытной группе представлены в процентах по отношению к контрольным, принятым за 100%), можно отметить, что у животных, которым вводили ККЭП, в ранний период (7 суток) активность катепсина Д была низкая (на 40%), а на 14-е сутки – более высокая (242% от контроля), при этом примерно одинаковые

значения установлены к концу периода наблюдений и рассасывания кровоизлияния. Можно констатировать, что введение ККЭП нивелировало резкие колебания активности изучаемого протеолитического лизосомального фермента в стекловидном теле интактного глаза кроликов после лечения и обеспечивало у них стабильность системной реакции.

Как и следовало ожидать, наиболее сильное действие введение ККЭП вызывало в стекловидном теле травмированного глаза подопытных животных. Так, уже на 7-е сутки уровень активности катепсина Д у кроликов после лечения более чем в два раза превышал контрольный. Эта же картина сохранялась в течение 14 суток наблюдений и только к 21-м суткам активность фермента заметно снизилась, хотя и оставалась выше контрольных значений (на 35%).

Таким образом, введение ККЭП при экспериментальном гемофтальме вызывала резкое повышение (более чем в 2 раза) активности катепсина Д в травмированном стекловидном теле в активный период рассасывания кровоизлияния (7–14-е сутки) по сравнению с животными, которых не лечили. В интактном стекловидном теле глаза леченых кроликов введение ККЭП стабилизировало динамику активности фермента по сравнению с показателями контрольной (нелеченой) группы на протяжении всего периода наблюдений.

Представленные в табл. 5 данные подтверждают динамику активности катепсина Д в сосудистой оболочке травмированного и интактного («здорового») глаза при экспериментальном гемофтальме. В норме данный фермент присутствует в умеренном количестве как в крови, так и в тканях. Как правило, при патологических состояниях и травмах его активность в крови и тканях резко повышается, что объясняется увеличением проницаемости, а также деструкцией лизосомальных и клеточных мембран [17, 25].

В контрольной группе умеренное повышение активности катепсина Д в сосудистой оболочке интактного глаза отмечено только на 14-е сутки после травмы, в остальные сроки наблюдения её значение не отличалось от нормального. Следует отметить, что именно на 14-е сутки было зафиксировано резкое снижение активности данного фермента в стекловидном теле интактного глаза. Сопоставление этих фактов дает возможность объяснить

описанное явление задержкой ферментативного звена в сосудистой оболочке, очевидно, вследствие снижения сосудистой проницаемости в этот период.

В сосудистой оболочке травмированного глаза у животных контрольной группы наблюдалось резкое (в 5 раз) повышение активности катепсина Д уже на 7-е сутки после травмы. В последующий период (14–21 сутки) активность фермента несколько снижалась, однако оставалась в 2–2,5 раза выше нормы.

Введение ККЭП животным с экспериментальным гемофтальмом заметно усиливало системную реакцию в сосудистой оболочке. Активность катепсина Д в сосудистой оболочке интактного глаза у животных, которым вводили ККЭП, была достоверно повышена весь период наблюдения с максимумом на 14-е сутки (на 86% выше нормы).

Еще более резкое повышение активности фермента после введения ККЭП зафиксировано в сосудистой оболочке травмированного глаза. На 7 и 14-е сутки после травмы показатель увеличивался примерно в 4 и 4,6 раза, а к концу периода наблюдений (21-е сутки) активности фермента повысилась в 7 раз.

При сопоставлении временного изменения активности катепсина Д в тканях травмированного глаза в контрольной и опытной группах можно отметить следующие тенденции.

В травмированном стекловидном теле глаза у кроликов, которых не лечили, отмечалось стабильно повышенное содержание катепсина Д на протяжении всего периода наблюдения и даже некоторая тенденция к его повышению. В то же время в травмированном стекловидном теле кроликов, которым вводили ККЭП, определялось постепенное выраженное снижение активности данного фермента. Так, на 7-е сутки активность катепсина Д в стекловидном теле глаза у животных, которым вводили ККЭП, превышала контрольные показатели в 2,3 раза, а на 21-е сутки – в 1,3 раза. Таким образом, как и в случае с КФ, зафиксировано постепенное уменьшение разницы между опытными и контрольными показателями по мере клинического выздоровления (рассасывания интравитреального кровоизлияния). Это еще раз указывает на общий источник происхождения этих гидролитических ферментов.

Приведенные факты свидетельствуют, что одним из основных механизмов эффективности введения ККЭП при лечении гемофтальма является активизация гидролитических лизосомальных ферментов. Проведенное исследование также показало, что протеолитические ферменты эмбрионально-клеточного происхождения не вызывают вредных побочных эффектов и своевременно элиминируются из зоны повреждения.

Нами проведено патоморфологическое изучение тканей глаза после введения ККЭП при экспериментальном гемофтальме на этапах посттрансплантационного периода.

Микроскопическое исследование препаратов показало, что уже через 3 суток после введения ККЭП наблюдалось активное рассасывание кровоизлияния в стекловидное теле глаза. Кровяной сгусток интенсивно инфильтрован макрофагами, лимфоцитами и нейтрофилами. Происходят активный фагоцитоз и элиминация эритроцитов из стекловидного тела (рис. 1).

У экспериментальных животных контрольной группы в этом сроке наблюдения рассасывание кровоизлияния происходит недостаточно. Отмечается кровенаполнение сосудистой оболочки. Однако клеточная инфильтрация выражена менее интенсивно (рис. 2).

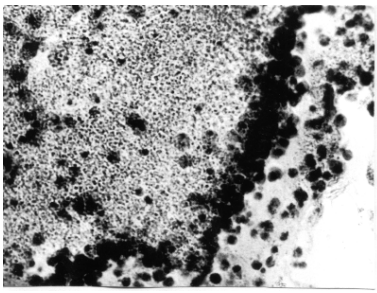


Рис. 1. Выраженная клеточная инфильтрация кровоизлияния в стекловидное тело глаза на 3-и сутки после введения ККЭП. Окраска гематоксилином и эозином, ×380.

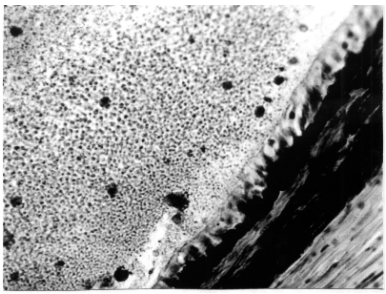


Рис. 2. Единичные макрофаги в области кровяного сгустка в стекловидном теле глаза на 3-и сутки после экспериментального гемофтальма (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином, ×380.

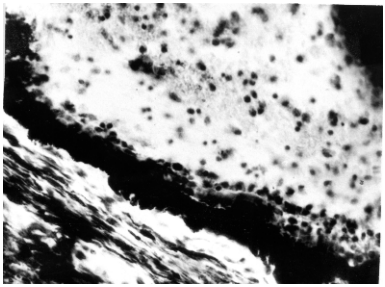


Рис. 3. Выраженная полиморфная клеточная инфильтрация остатков кровоизлияния в стекловидное тело глаза на 7-е сутки после введения ККЭП (основная группа). Окраска гематоксилином и эозином, ×380.

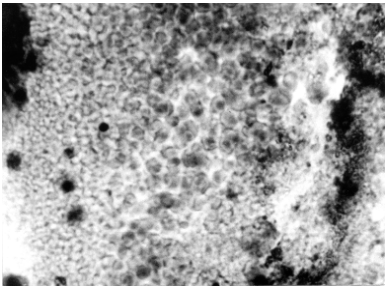


Рис. 4. Выраженная клеточная инфильтрация кровяного сгустка в стекловидном теле глаза (контрольная группа) на 7-е сутки после экспериментального гемофтальма. Окраска гематоксилином и эозином, ×380.

К 7-м суткам наблюдения после введения ККЭП отмечается активное рассасывание кровяного сгустка. Определяются интенсивная клеточная инфильтрация, большое количество активно фагоцитирующих макрофагов, остатки гемолизированных эритроцитов, сгусток утратил свою «структурированность». Сосудистая оболочка полнокровная (рис. 3).

В контрольной группе экспериментальных животных в этом сроке наблюдения рассасывание кровоизлияния происходит менее активно. Сгусток сохранил свою «структурированность» и плотность, определяется клеточная инфильтрация (рис. 4).

К 14-м суткам после применения ККЭП кровоизлияние в стекловидном теле глаза не определялось, оболочки глазного яблока имели неизмененную морфологическую структуру, клеточная инфильтрация отсутствовала.

В контрольной группе животных в этом сроке наблюдения кровоизлияние сохранялось. Отмечалась интенсивная клеточная инфильтрация сгустка с признаками воспаления (рис. 5).

Таким образом, проведенное гистологическое исследование показало, что после экспериментального гемофтальма в стекловидном теле глаза развиваются процессы резорбции кровяного

сгустка, характеризующиеся одинаковыми морфологическими проявлениями как в контрольной группе, так и в группе животных после введения ККЭП. Однако резорбция кровоизлияния происходит быстрее после введения ККЭП.

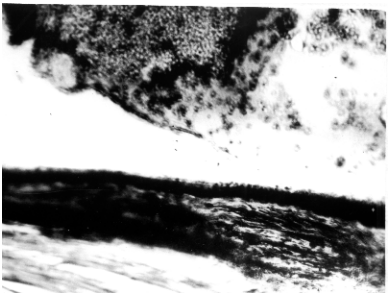


Рис. 5. Клеточная инфильтрация кровяного сгустка, сохранившегося в стекловидном теле глаза (контрольная группа) на 14-е сутки после экспериментального гемофтальма. Окраска гематоксилином и эозином, ×420.

Рассасывание внутриглазного кровоизлияния происходит на фоне воспалительной реакции, которая отмечается уже на 3-и сутки после возникновения гемофтальма. К 14-м суткам после применения ККЭП явления воспаления не определяются, клеточная инфильтрация отсутствует, стекловидное тело прозрачное, кровоизлияние рассасывается.

В контрольной группе экспериментальных животных не происходит полного рассасывания гемофтальма. В период наблюдения сохраняется кровоизлияние с клеточной инфильтрацией.

Таким образом, можно заключить, что введение ККЭП является высокоэффективным методом рассасывания гемофтальма, не оказывающим патологического воздействия на ткани глаза (по данным гистологического исследования).

Однако отсутствие единой оптимальной схемы применения клеточной терапии в зависимости от этиологии внутриглазного кровоизлияния, а также единых методик введения клеток делают проблему применения клеточной терапии в комплексной лечении гемофтальма актуальной и требующей активного изучения. Научные и клинические исследования должны быть направлены на оптимизацию методик клеточной терапии и разработку новых сочетанных методов воздействия.

Далее представлены результаты изучения возможных механизмов клинического воздействия разных способов введения изучаемого препарата. С этой целью исследовали показатели коагуля-

ционного и фибринолитического звеньев гемостаза у животных с травматическим гемофтальмом при однократном внутривенном введении ККЭП, при однократной инъекции парабульбарно и при их комбинации. Показатели изучали на пике травматического процесса на 3-и и 7-е сутки после нанесения травмы (табл. 6).

Полученные нами данные показывают, что на 3-и сутки после травмы однократное введение ККЭП как парабульбарно (группа I), так и внутривенно (группа II) не приводили к нормализации изучаемых показателей гемостаза и фибринолиза. Общее время свертывания (T_2) и ИК в этих группах были достоверно ниже исходных показателей, что свидетельствовало о гиперкоагуляционном сдвиге гемостаза; показатели суммарной и неферментативной фибрино-

Таблица 6. Сравнительный анализ эффективности различных методов введения ККЭП по показателям гемокоагуляции и фибринолитической активности при лечении экспериментального травматического гемофтальма

Группа, срок наблюдения	Показатели			
	Т2, мин	ИК, усл.ед.	СФА, усл.ед.	НФА, усл.ед.
Исходный уровень (n = 12)	9,8 ± 0,36	5,1 ± 0,19	38,2 ± 2,1	18,8 ± 1,13
I (парабульбарное введение ККЭП) 3-и сутки (n = 5)	5,67 ± 1,12*	3,56 ± 0,33*	26,9 ± 1,03*	13,0 ± 0,79*
I (парабульбарное введение ККЭП) 7-е сутки (n = 5)	13,4 ± 1,80	6,78 ± 0,84	30,1 ± 1,13*#	15,5 ± 2,11
II (внутривенное введение ККЭП) 3-и сутки (n = 5)	4,8 ± 1,1*#	3,94 ± 0,3*	24,7 ± 1,83*#	12,7 ± 0,56*
II (внутривенное введение ККЭП) 7-е сутки (n = 5)	8,33 ± 0,56#	5,26 ± 0,78	31,4 ± 0,89*#	14,6 ± 0,83*
III (парабульбарное и внутривенное введение ККЭП) 3-и сутки (n = 5)	7,83 ± 0,09	4,08 ± 0,34*	30,3 ± 0,48*	14,0 ± 0,33*

Примечания: * – различия достоверны по отношению к исходным показателям; # – различия достоверны по отношению к показателям группы III .

литической активности (СФА и НФА) также были ниже исходных, что указывало на ее угнетение. Изучаемые показатели в группе III (комбинация двух способов введения) были несколько выше, чем в группах I и II, а показатель T_2 достигал исходного уровня.

На 7-е сутки после травмы показатель свертывания крови в группах I и II (однократные инъекции) нормализовался, а показатель фибринолитической активности крови оставался ниже исходного, что указывало на угнетение ферментативного звена этой системы при парабульбарной инъекции и обоих звеньев (ферментативного и неферментативного) при внутривенной. В группе III (комбинация двух инъекций) наблюдалась иная картина. Повышенные показатели гемокоагуляции (T_2 и ИК) свидетельствовали о гипокоагуляционном сдвиге гемостаза в этот период наблюдений, а повышенный показатель фибринолитической активности – об активизации всех звеньев фибринолиза.

Таким образом, эффект применения ККЭП при двойной схеме введения препарата следует считать полностью адекватным ситуации, а данную схему введения препарата наиболее эффективной при лечении экспериментального травматического гемофтальма.

При рассасывании кровоизлияний в любом органе и ткани первостепенную роль играет состояние общей и местной фибринолитической активности. Степень фибринолитической активности, в первую очередь, зависит от общего тромбодинамического потенциала в циркуляторном русле. Известно, что практически при любой травме тромбодинамический потенциал сдвигается в сторону готовности к повышению свертывающей активности крови, что имеет глубокий, эволюционно обусловленный биологический смысл, так как при любой травме возможно кровотечение. Таким образом, гиперкоагуляционный сдвиг входит в комплексную неспецифическую «alarm»-реакцию, сопровождающую любое достаточно сильное стрессорное воздействие [17, 18, 20, 21].

Однако чрезмерное повышение свертывающего потенциала крови может повлечь за собой функциональные нарушения в фибринолитическом звене системы гемостаза, которое является антиподом коагуляционного звена, и в физиологических условиях. Динамическое равновесие двух вышеуказанных процессов обеспечивает гемостатический гомеостаз. Травма вызывает патологи-

ческие изменения в обоих звеньях, влияющих на агрегатное состояние крови, и поэтому важна оценка степени этих изменений при любом терапевтическом вмешательстве, особенно направленном на рассасывание кровоизлияния, в частности при лечении гемофтальма.

Первоочередной задачей при лечении гемофтальма является восстановление или даже повышение как локальной, так и общей фибринолитической активности крови на ранних стадиях травматического процесса для скорейшего рассасывания кровяного сгустка. С этой целью в офтальмологии используются различные нативные тромболитические препараты (фибринолизин, активаторы плазминогена, протеолитические ферменты). Все они, наряду с высокой эффективностью, имеют ряд существенных недостатков, ограничивающих их применение [11]. Поэтому актуальной задачей остается поиск новых препаратов тромболитического действия для лечения внутриглазных кровоизлияний.

Каковы же возможные источники фибринолитической активности ККЭП? Известно, что печень является главным гемопоэтическим органом периода эмбриогенеза у млекопитающих. Определенная часть стволовых клеток является предшественниками купферовских клеток печени (мононуклеарных фагоцитов), которые появляются в развивающейся печени еще до формирования костного мозга у эмбриона [2]. Купферовские клетки, являясь тканевыми макрофагами, содержат богатый ферментативный аппарат, в том числе большое количество активаторов плазминогена. Эти вещества, очевидно, активируют фибринолиз при введении ККЭП и способствуют быстрому рассасыванию кровоизлияний. Неферментативное звено фибринолиза при введении ККЭП, очевидно, может активироваться и другой клеточной популяцией печени – тучными клетками, содержащими большое количество гепарина. Эти клетки, по мнению некоторых авторов, также происходят из макрофагального ряда [23].

Следует отметить, что в нормальном стекловидном теле почти отсутствуют клеточные структуры, в том числе тканевые макрофаги. При этом показано, что, хотя некоторые ткани глаза содержат активаторы и ингибиторы фибринолиза, стекловидное тело в норме

обладает очень низкой фибринолитической активностью [11, 20]. При развитии гемофтальма в организме, очевидно, активируется дополнительный «аварийный» макрофагально-моноцитарный механизм гемокоагуляции и фибринолиза [3]. В физиологических условиях эта группа клеток практически не продуцирует факторы свертывания крови и фибринолиза. Однако при активации продуктов тканевого распада и ряда других веществ они начинают продуцировать как коагулянтные (тромбопластин), так и антикоагулянтные факторы (активаторы плазминогена, внутриклеточные киназы, расщепляющие фибрин и т. п.) [9]. Поскольку кровеносные сосуды в стекловидном теле глаза отсутствуют, дифференциация гематогенных моноцитов в макрофаги в поврежденном участке глаза представляется единственно возможным источником фагоцитарной активности в данной структуре на протяжении достаточно длительного периода. Эти клетки, очевидно, обеспечивают повышение фибринолитической активности в строго ограниченном участке и не влияют на системный фибринолиз, о чем свидетельствуют результаты нашего эксперимента – показатели гемостаза у кроликов, которых не лечили. В результате этого кровоизлияние рассасывается длительное время, а фибриновые волокна при нелеченом гемофтальме рассасываются неполностью.

Следовательно, как наши, так и данные литературы свидетельствуют, что при травматическом гемофтальме защитно-компенсаторые механизмы организма недостаточно сильны для самостоятельного лизиса интравитреальных геморрагий, так как стекловидное тело глаза обладает очень низкой фибринолитической и значительной фибринстабилизирующей активностью [20].

На этом фоне применение ККЭП, скорее всего, является «заместительной» терапией, так как суспензия содержит большое количество клеток со всем набором антикоагулянтных факторов различной природы как ферментативных (активаторы плазминогена), так и неферментативных (гепарин), но, как показали наши исследования, превалирует ферментативное звено. Применение препарата ККЭП не только ускоряло рассасывание глазного кровоизлияния у подопытных животных, но и способствовало полному исчезновению фибриновых волокон в пораженном участке глаза.

Таким образом, при введении ККЭП восстанавливается и в необходимой степени активизируется системный фибринолиз у животных с экспериментальным гемофтальмом, что способствует активному и полному рассасыванию травматического кровоизлияния и может быть использовано для направленного лечения глазных кровоизлияний различной этиологии.

Рассасывание кровоизлияния в стекловидном теле глаза включает несколько взаимосвязанных механизмов, из которых важнейшими считают следующие: гемолиз, фибринолиз и фагоцитоз [11]. «Рабочими инструментами» этих и других физиологических механизмов являются гидролитические, главным образом протеолитические, ферменты. В этих процессах участвуют протеазы разных типов – щелочные и нейтральные сериновые протеиназы, к которым относятся плазмин и многочисленные тканевые активаторы плазминогена, а также кислые лизосомальные протеиназы или катепсины [5].

Успешное рассасывание кровоизлияния обусловлено слаженным действием гидролитических ферментов. Известно, что в интактном стекловидном теле глаза гидролитические ферменты практически отсутствуют. При наличии крови внутри глаза к ее рассасыванию подключается ферментативный арсенал макрофагов моноцитарного происхождения. Поскольку в стекловидном теле глаза практически отсутствует васкуляризация, эти клетки могут попасть в него только из сосудистой оболочки глаза, что представляет собой относительно сложный процесс и замедляет рассасывание глазных кровоизлияний в естественных условиях, а при достаточно обширных кровоизлияниях этот процесс остается незавершенным и способствует возникновению различных деформаций как стекловидного тела , так и других структур глаза.

Учитывая вышеизложенное, в настоящее время практически в любой курс лечения гемофтальма для ускорения лизиса кровяного сгустка вводятся препараты протелитических ферментов растительного и животного происхождения. В основном это препараты трипсина и трипсиноподобных щелочных протеиназ (химотрипсина, папаина и др.) [11]. Особой разновидностью протеолитических препаратов являются фибринолитики (фибринолизин, стрептокиназа, урокиназа и др.), действие которых является

узконаправленным и заключается в лизисе фибрина. Трипсиноподобные протеиназы обладают более широким спектром действия относительно различных белков. Однако максимальная активность их действия развивается в зоне щелочного или нейтрального pH, в то время, как в зоне тканевой деструкции – локальный тканевой метаболический ацидоз в силу накопления окисленных продуктов распада органических веществ, в том числе белков [16]. Более физиологичным в этих условиях было бы действие кислых тканевых гидралаз, в том числе катепсинов – кислых тканевых протеиназ лизосомального происхождения. Кроме того, известно достаточно большое количество ингибиторов трипсиноподобных протеиназ крови, которые ограничивают срок действия и активность этих ферментов. В то же время не доказано существование специфических ингибиторов тканевых катепсинов, хотя есть предположения о существовании у некоторых из известных ингибиторов общего антипротеолитического потенциала вне клетки [5].

В настоящее время лекарственных препаратов, содержащих изолированные тканевые катепсины, не существует. С этой целью может быть целесообразным применение клеток эмбриональной печени, которые отличаются активным метаболизмом, устойчивостью к действию гипоксии и ацидоза, содержат большое количество разнообразных ферментов, в том числе лизосомальных [3]. Как показывает проведенный эксперимент, их введение значительно стимулировало протеолитическую активность в тканях травмированного глаза и ускоряло рассасывание гемофтальма.

При этом можно отметить дополнительные положительные аспекты динамики протеолитической активности, обусловленной введением ККЭП. Известно, что активность лизосомальных протеаз в патологических условиях направлена на ликвидацию поврежденных клеточных структур, однако их чрезмерный выброс или длительное воздействие могут вызывать нежелательные деструктивные эффекты и мешать полноценной репарации в зоне повреждения. Очевидно, подобные эффекты имеют место у кроликов, которых не лечили, у них клинически наблюдаемое рассасывание кровоизлияния не сопровождалось снижением активности катепсина Д в стекловидном теле травмированного глаза. При этом у животных, которых не лечили, еще длительное время

наблюдали диффузное помутнение стекловидного тела глаза. В то же время, у кроликов, которым вводили ККЭП, напротив, активное рассасывание кровоизлияния сопровождалось заметным снижением содержания катепсина Д в стекловидном теле глаза. При этом у животных после введения ККЭП гораздо раньше офтальмоскопически отмечалась полная прозрачность стекловидного тела глаза. Приведенный факт указывает на выраженное положительное действие введения ККЭП при рассасывании гемофтальма и отсутствие побочных эффектов клеточной терапии при лечении гемофтальма.

Заслуживает внимания вопрос не только о путях поступления протеолитических ферментов в стекловидное тело глаза, но и о пути их удаления по мере выполнения ими необходимых функций. В этом аспекте важно обсудить направленность динамики протеолитической активности в сосудистой оболочке травмированного глаза. Именно через сосудистую оболочку ферменты попадают в стекловидное тело глаза, а также, очевидно, удаляются из него.

При сопоставлении динамики протеолитической активности в стекловидном теле и сосудистой оболочке травмированного глаза у нелеченых животных установлен разнонаправленный их характер. В то время, как в стекловидном теле глаза сохранялся стабильно повышенный уровень протеолитической активности и даже, как уже отмечалось, некоторое её повышение, а в сосудистой оболочке – выраженное её снижение. В ранние сроки (7-е сутки) это можно объяснить усиленной «поставкой» ферментов, которая является естественной реакцией на травму. В более поздние сроки (21-е сутки) «поставка» ферментов замедляется, однако их усиленное выведение не отмечается, о чем свидетельствовало снижение показателя в сосудистой оболочке, хотя и не до нормальных значений.

У животных, которым вводили ККЭП отмечалась противоположная динамика протеолитической активности как в стекловидном теле, так и в сосудистой оболочке травмированного глаза. В стекловидном теле глаза уровень протеолитической активности снижался по мере клинического выздоровления, а в сосудистой оболочке – резко повышался, что можно объяснить активным

выведением ферментов через сосудистую оболочку глаза в общее циркуляторное русло. В целом это можно расценивать как еще один позитивный аспект эмбрионально-клеточной терапии.

Таким образом, при травматическом экспериментальном гемофтальме отмечалось резкое повышение активности лизосомальных гидролитических ферментов в тканях как травмированного, так и интактного глаза. Системная реакция выражалась в скачкообразных изменениях активности катепсина Д в стекловидном теле и сосудистой оболочке интактного глаза. В ходе спонтанного рассасывания интравитреального кровоизлияния протеолитическая активность снижалась только в сосудистой оболочке глаза, а в травмированном стекловидном теле глаза оставалась стабильно повышенной.

Использование ККЭП вызывало резкое повышение активности лизосомальных гидролитических ферментов в тканях глаза кроликов основной группы по сравнению с показателями контрольной. Системная реакция в стекловидном теле глаза у животных после введения ККЭП носила стабильный характер. По мере рассасывания кровоизлияния активность катепсина Д в стекловидном теле глаза снижалась, а в сосудистой оболочке – повышалась, что свидетельствовало об активном переходе протеолитических ферментов в общее кровеносное русло с последующей элиминацией.

Безусловно, объективным доказательством эффективности проводимой терапии служит патоморфологическое исследование органов, клеток и тканей. Проведенное гистологическое исследование показало, что после экспериментального гемофтальма в стекловидном теле глаза происходят процессы резорбции кровяного сгустка, характеризующиеся одинаковыми морфологическими проявлениями как в контрольной, так и в группе животных после применения ККЭП. Однако резорбция происходит быстрее после введения ККЭП.

Вероятно, кровоизлияние рассасывается за счет защитно-компенсаторных реакций организма, однако внутренних резервов для лизиса кровоизлияния не достаточно. Поэтому целесообразным является применение клеточной терапии. Возможно, с одной стороны, биологически активные вещества, продуцируемые и содержащиеся в ККЭП, активизируют собственные компенсаторные

механизмы, способствующие рассасыванию кровоизлияний, а с другой – эмбриональная печень содержит большое количество стволовых клеток, клеток моноцитарно-макрофагального ростка кроветворения различной степени зрелости. Введение этих клеток может выполнять заместительную функцию, способствуя интенсификации фагоцитоза, усилению фибринолиза и, в конечном счете, рассасыванию гемофтальма.

Выраженный положительный терапевтический эффект после применения ККЭП во многом зависит от оптимальной схемы их введения. Нами изучены различные способы введения ККЭП (парабульбарный, внутривенный и их сочетание). При экспериментальном гемофтальме критерием максимальной эффективности служили показатели коагуляционного и фибринолитического звеньев гомеостаза. Наиболее эффективной было сочетанное введение ККЭП, что свидетельствует об эффективности системного лечения сосудистой патологии (в частности, органа зрения), поскольку локальные изменения в «locus morbi» являются проявлением дезорганизации системы на организменном уровне.

Таким образом, введение ККЭП экспериментальным животным с частичным и субтотальным гемофтальмом в ранние сроки после кровоизлияния является эффективным методом рассасывания гемофтальма и может быть рекомендовано для использования в широкой офтальмологической практике, что позволит сократить сроки реабилитации больных и повысить функциональные показатели органа зрения.

Литература

1. Алифанов И.С., Шантырь Л.И., Доронкина Е.К. Ультразвуковые и нейрофизиологические аспекты диагностики офтальмологических осложнений при сахарном диабете. – Днепропетровск, 2008. – С. 42.
2. Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи совр. биологии. – 1992. – Т. 112, №1. – С. 88–99.
3. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. – М.: Медицина, 1988. – 458 с.
4. Бездетко П.А. Экспериментально-клиническое обоснование применения холода в лечении тяжелой сосудистой патологии глаза (пролиферативной диабетической ретинопатии, неоваскулярной глаукомы, тромбоза ЦВС, гемофтальма, интермедиарного увеита): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Одесса, 1992. – 30 с.

5. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоров'я, 1988. – 195 с.
6. Грищенко В.И., Юрченко Г.Г. Влияние факторов низкотемпературного консервирования на репродуктивные эмбриональные фетальные клетки // Проблемы криобиологии. – 1998. – №4. – С. 7–13.
7. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии // Междунар. мед. журнал. – 1999. – Т. 5, №4. – С. 6–10.
8. Грищенко В.І., Снурніков О.С., Дьомін Ю.А. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування ембріональних та фетальних клітин людини в офтальмологічній практиці: Метод. рекомендації. – Харків, 2000. – 15 с.
9. Грищенко В.И. Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 7–8.
10. Грищенко В.И., Демин Ю.А., Гончарук Е.И. и др. Характеристика эмбрионального препарата «Гемонейронал» // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 38.
11. Гундорова Р.А., Малаев А.А., Южаков А.М. Травмы глаза. – М.: Медицина, 1986. – 364 с.
12. Демин Ю.А., Петренко А.Ю., Гончарук Е.И. Новый препарат «Гемонейронал» в комплексном лечении посттравматического гемофтальма // Укр. журнал екстремальної медицини. – 2001. – Т. 2, №4. – С. 57–61.
13. Имшенецкая Т.А., Бирич Т.А., Улащик В.С. Физические методы в комплексной терапии гифем и гемофтальма // Офтальмолог. журнал – 1988. – №5. – С. 306–309.
14. Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Молнар Е.М. Трансплантация фетальных тканей человека: анализ состояния, проблемы и перспективы развития // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека: Сб. науч. ст. Международ. ин-та биол. медицины. – М., 1996. – С. 5–9.
15. Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Климова Е.М. Обоснование и практические результаты применения эмбриональных препаратов в клинической практике // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 33.
16. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека – М: Мир, 1993. – Т. 2. – 415 с.
17. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия: Пер. с англ. – М.–СПб, 1999. – 368 с.
18. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1988. – 254 с.
19. Морозов В.И., Яковлев А.А. Фармакотерапия глазных болезней. – М.: Медицина, 1998. – 335 с.
20. Ромащенко А.Д., Гундорова Р.А., Скипетров В.К. Механизм действия фибринолизина и обоснование целесообразности его применения при травматическом гемофтальме // Офтальмолог. журнал. – 1980. – №1. – С. 4.
21. Селье Г. Стресс без дистресса. – Рига: Виеда, 1992. – 106 с.
22. Семенченко О.А., Петренко А.Ю., Сукач А.Н. и др. Гипотермическое хранение клеток и тканей эмбрионов человека // Проблемы криобиологии. – 2001. – №2. – С. 80–84.
23. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. – М.: Медицина, 1984. – 320 с.
24. Сухих Г.Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 125, Прил. 1. – С. 3–13.
25. Nowak T.S. Synthesis of heat shock/stress proteins during cellular injury // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1993. – Vol. 679 – P. 142–156.

Содержание

Предисловие..... 5

Фундаментальные аспекты криобиологии

Механизмы защиты клеток от криоповреждения вне- и внутриклеточным льдом..... 9
Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф.

Биофизические подходы к исследованию влияния низких температур на биомакромолекулы..... 45
Нардид О.А., Розанова Е.Д., Зинченко А.В., Щетинский М.И., Науменко Е.И., Репина С.В.

Синтез, физико-химические и криозащитные свойства окси-этильных производных спиртов..... 73
Компаниец А.М., Чеканова В.В., Николенко А.В., Зинченко А.В., Пахомова Ю.С.

Криозащитные среды на основе комбинаций криопротекторов для замораживания биологических объектов..... 101
Компаниец А.М., Богданчикова О.А., Пахомова Ю.С., Овсянников С.Е., Стрибуль Т.Ф.

Холодовая адаптация пойкилотермных и гетеротермных животных..... 127
Гулевский А.К., Щенявский И.И., Релина Л.И., Грищенкова Е.А., Загнойко В.И., Терещенко О.С.

Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°С в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования..... 165
Репин Н.В., Юрченко Т.Н.

Влияние хлорпромазина на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов и на структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран..... 207
Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Ершов С.С., Бондаренко В.А.

Структурно-функциональные изменения стволовых гемопоэтических клеток кордовой крови под действием криопротекторов и низких температур..... 229
Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М., Зубова О.Л.

Индукция эффектов перекрестной адаптации при помощи оксидативного стресса для повышения эффективности криоконсервирования биологических объектов..... 271
Зинченко В.Д., Белых И.А., Буряк И.А., Горячая И.П., Говор И.В.

Криоконсервирование и гипотермическое хранение клеток, тканей и изолированных органов

Криоконсервирование стволовых/прогениторных клеток фетальных тканей..... 295
Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Сукач А.Н., Волкова Н.А., Скоробогатова Н.Г., Тарасов А.И., Труфанова Н.А., Мазур С.П.

Криоконсервирование эмбрионов, репродуктивных клеток и тканей человека и животных..... 337
Грищенко В.И., Копейка Е.Ф., Чуб Н.Н., Петрушко М.П., Пиняев В.И., Крамар М.И.

Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез..... 361
Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Легач Е.И., Кирошка В.В., Устиченко В.Д., Билявская С.Б., Пахомов А.В., Самченко И.И., Дудецкая Г.В.

Криоконсервирование промышленных и коллекционных штаммов микроорганизмов..... 401
Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф., Ананьина А.Е., Бабинец О.М., Артуянц А.Ю.

Современные подходы к гипотермическому хранению изолированных органов..... 441
Черкашина Д.В., Петренко А.Ю., Фуллер Б.Дж., Грин К.Дж., Семенченко О.А., Сомов А.Ю., Сосимчик И.А., Ткачева Е.Н.

Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития..... 469
Чижевский В.В., Прокопюк О.С., Грошевой М.И., Липина О.В., Прокопюк В.Ю.

Аппаратурное обеспечение низкотемпературного консервирования биологических объектов, гипотермических воздействий, криотерапии и криохирургии..... 487
Дудкин С.Ф., Соколов В.А., Федорович А.Н.

Фундаментальные и прикладные аспекты криомедицины

Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза..... 501
Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Луценко Е.Д., Останков М.В., Гаевская Ю.А., Бабенко Н.Н., Рассоха И.В., Сафранчук О.В., Бондарович Н.А., Ямпольская Е.Е., Порожан Е.А., Димитров А.Ю., Челомбитько О.В., Губина Н.Ф., Гольцев К.А., Гриша И.Г., Кравченко М.А., Кожина О.Ю., Борисов П.А., Носенко Л.А.

Применение низких температур при моделировании патологических состояний в эксперименте..... 613
Чиж Н.А., Ковалев Г.А., Введенский Б.П., Слета И.В., Гальченко С.Е., Шкодовская Н.Ю., Сандомирский Б.П.

Новый подход к созданию сосудистых протезов малого диаметра..... 623
Сандомирский Б.П., Бызов Д.В., Михайлова И.П., Чиж Н.А., Сынчикова О.П.

Влияние охлаждения на структурно-функциональное состояние гематоэнцефалического барьера..... 655
Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Бабийчук Г.А.

Применение био- и нанотехнологий для создания и исследования состояния криоконсервированных клеточных препаратов..... 705
Грищенко В.И., Гончарук Е.И., Волкова Н.А., Павлович Е.В., Юхта М.С. , Коструб А.А., Блонский Р.И., Засаднюк И.А.

Экстракты криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят: получение и биологическое действие..... 719
Гальченко С.Е., Рогоза Л.А., Слета И.В., Сандомирский Б.П.

Эффективность клеточной терапии в лечении гемофтальма.... 739
Дёмин Ю.А., Юрченко Т.Н., Шарлай Т.М., Дёмина М.Ю.

Наукове видання
Національна академія наук України
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Гольцев Анатолій Миколайович
Гордієнко Євген Олександрович
Бабійчук Георгій Опанасович
та ін.

Актуальні проблеми кріобіології і кріомедицини

Російською мовою

Харків, 2012

Художнє оформлення В.С. Холодний
Коректор Л.В. Рудоман
Комп'ютерна верстка В.С. Холодний

Підп. до друку Формат 60x90/16. Папір офс. №1
Друк офс. Ум. друк. арк.
Ум. фарбо-відб. Обл.-вид. арк.
Наклад 250 прим. Зам. №

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
61015 Харків, вул. Переяславська, 23

Видавничий дім «Райдер»
61000 Харків, просп. Гагаріна, 20
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
серія А00№506901 від 10.07.2002