Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
**Институт физиологии**
Коми научного центра Уральского отделения РАН
**Институт проблем криобиологии и
криомедицины** НАН Украины

# Теоретические и практические аспекты современной криобиологии

МАТЕРИАЛЫ
Международной
заочной
научно-практической
конференции

(24 марта 2014 г. Россия – Украина)

Сыктывкар 2014

**УДК 612.014.43:57.086.13(063)**

**Теоретические и практические аспекты современной криобиологии.** Материалы Международной заочной научно-практической конференции (24 марта 2014 г. Россия – Украина). – Сыктывкар, 2014. – 412 с. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН).

Настоящий сборник материалов представляет собой последние достижения в изучении аспектов современной криобиологии, которые включают в себя исследование механизмов криоповреждений и криозащиты, гипотермических состояний, разработку технологий криоконсервирования различных биологических объектов и определение роли криобанков в сохранении биоразнообразия флоры и фауны.

Целью данной конференции было не только ознакомление научного сообщества с современными достижениями в криобиологии, но объединение единомышленников разных стран по научным интересам.

Принятые материалы публикуются в авторской редакции.

Надеемся, что сборник будет интересен не только опытным специалистам, но и молодым ученым.

**Организационный комитет конференции:**

Председатель Оргкомитета – $\boxed{\text{Оводов Ю.С.,}}$ академик РАН
Сопредседатель Оргкомитета – Гольцев А.Н., академик НАН Украины
Заместители председателя Оргкомитета –
Гордиенко Е.А., член-корр. НАН Украины
Полежаева Т.В., д.б.н., доцент
Кулешова Л.Г., д.б.н., ст.н.с.
Секретарь Оргкомитета – Зайцева О.О., к.б.н., доцент

**ISBN 978-5-89606-520-3**



**Организаторы конференции выражают искреннюю благодарность всем ее участникам.**

## СОДЕРЖАНИЕ

### СЕКЦИЯ I
### МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КРИОЗАЩИТЫ

## СЕКЦИЯ II
## КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, МИКРООРГАНИЗМОВ, ГАМЕТ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ, НАУКЕ, ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ДРУГИХ ОТРАСЛЯХ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА

**СЕКЦИЯ IV**
**ГИПОТЕРМИЯ И ЭКСТРЕМАЛЬНАЯ КРИОТЕРАПИЯ**

# СЕКЦИЯ I

# МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ И КРИОЗАЩИТЫ

# ТЕРМОМЕХАНИЧЕСКОЕ РАСТРЕСКИВАНИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД ДО ТЕМПЕРАТУР ЖИДКОГО АЗОТА

***Андреев А.А., *Садикова Д.Г., **Тихомиров А.М., **Фирсова А. В.**
**Институт биофизики клетки, Российской академии наук, Пущино, Россия*
***Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия*
E-mail: alandreev @mail.ru

В ходе процесса криоконсервации большое значение имеет стадия формирования твердой фазы (лед) и поведение этой твердой фазы в ходе охлаждения вплоть до температур, при которых происходит хранение криоконсервированного генетического материала, т.е. до температур жидкого азота (Fahy G.M. et al., 1980, Fahy G.M., 1987). Обычно в состав криозащитного раствора входит криопротектор (диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль и т.д.), минеральные соли и добавочные компоненты (яичный желток, сахара, белки, липиды и т.д.). Растворенные вещества снижают равновесную температуру замерзания воды с температурным коэффициентом, криоскопической константой 1,86˚C/M (Стромберг А. Г., Семченко Д. П., 1999). Поэтому замерзание растворов происходит при более низкой температуре, чем для дистиллированной воды. Рост кристаллов льда начинается при температуре замерзания соответствующего водного раствора, при этом, в процессе замерзания, концентрация растворенных компонентов в жидкой фазе раствора увеличивается, а температура замерзания соответственно понижается. Процесс формирования кристаллов льда и увеличение концентрации в жидкой части раствора продолжается по мере охлаждения вплоть до тех пор, пока раствор не становится настолько вязким, что формируется аморфный (витрифицированный) лед (Pegg D.E., et al, 1997). Объем, занимаемый кристаллами льда, обычно определяется многими факторами, поэтому существование кристаллических и витрифицированных областей является неизбежным следствием замерзания криозащитных растворов. Формирование льда при градуально повышающейся концентрации растворенных веществ в охлаждаемой жидкости формирует неоднородную среду. Интерес представляет поведение массива льда при дальнейшем понижении температуры до -196˚С. Охлаждение вызывает сжатие образовавшихся кристаллов льда (Иванов Б.Д., 2009). Температурные коэффициенты льда, замороженных растворов и аморфного льда сформированного из концентрированных растворов значительно различаются, поэтому при охлаждении это приводит к возникновению термомеханических напряжений (Rabin Y., Steif P.S., 1998, 2000, 2006). При относительно малых термомеханических напряжениях будут наблюдаться пластические деформации пропорциональные этим напряжениям. Когда они становится чрезмерными, будет наблюдаться разрыв в местах наименьшей прочности (Rabin Y. et al. 2006). В результате формируются отдельные частицы льда (Kroener C., Luyet B.J., 1966, RabinY., et al. 2006, Андреев А.А. и др., 2009). Так как процесс идет в твердой фазе и при значительных термомеханических напряжениях и деформациях, это может значительно влиять на выживаемость криоконсервированных клеток после процесса замораживания-хранения-оттаивания.

Мы исследовали формирование микрочастиц льда, их размер и форму в замороженных криозащитных растворах в ходе охлаждения (до -196˚С). Толщина слоя замораживаемой жидкости была 0,2 мм. Для регистрации фото и видео материалов использовали криомикроскоп на базе микроскопа Orthoplan (Германия), видеоокуляр НВ-35 (Россия) и компьютер. Температура регистрировалась автоматически в реальном времени на компьютер с помощью термометра АТТ-2006 (Тайвань), микротермопарой (0,1-0,15 мм, медь-константан).

Получены следующие результаты. При охлаждении криозащитного раствора начинается образование льда при температурах, как и предполагается теоретически, соответствующих криоскопической константе. Позднее образуется сплошной массив льда. Дальнейшее охлаждение массива приводит к тому, что при глубоком охлаждении начинается процесс его растрескивания на микрочастицы.

Температура, при которой начинается растрескивание, зависит от состава раствора, что очевидно определяется эластичностью образованной аморфной фазы льда. Для льда, образованного дистиллированной водой, растрескивание начинается уже при -46˚С ± 6,0 (n = 10), для физиологического раствора для осетровых рыб (ФР) при -63˚С ± 7 (n = 10), для ФР с добавлением 2М диметилсульфоксида (ДМСО) при - 129˚С ± 11 (n=4), для ФР с 2М ДМСО и яичным желтком 10% при -156˚С ± 9 (n=4).

Размер и форма микрочастиц льда определялись составом исходного раствора (рис.). Растрескивание льда, образовавшегося из дистиллированной воды, происходило случайным образом, размер и форма микрочастиц льда сильно различались, изопериметрический фактор формы, степень округлости частиц (Steiner J., 1838), составлял 0,64 ± 0,1 (n = 223). В присутствии криопротекторов микрочастицы льда имели обычно округлую форму, фактор формы в диапазоне 0,8 – 0,9 (рис.). Видно, что присутствие криопротекторов кардинально меняет характер растрескивания массива льда вследствие изменения термомеханических напряжений при сверхнизких температурах.

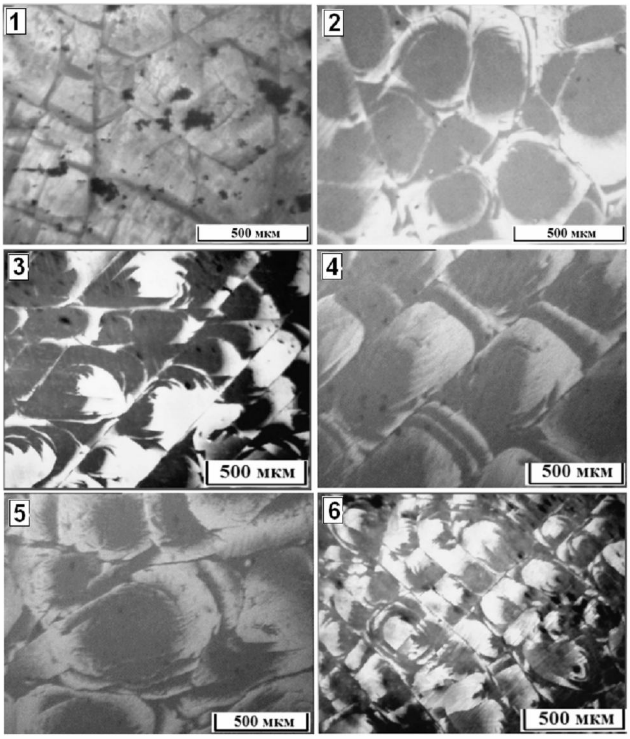



Рис. Микрочастицы льда в замороженных растворах при -196 °C. Фотографии сделаны в тонком слое (0,2 мм), проба находится в жидком азоте.

1. Дистиллированная вода. Фактор формы 0,64 ± 0,1 (n = 223).
2. ДМСО 2М. Фактор формы 0,84 ± 0,01 (n = 156).
3. Формамид 1М. Фактор формы 0,81 ± 0,06 (n = 48).
4. Этиленгликоль 1М. Фактор формы 0,86 ± 0,04 (n = 45).
5. Диметилформамид 1М. Фактор формы 0,84 ± 0,08 (n = 21).
6. Таурин 0,5 М. Фактор формы 0,87 ± 0,02 (n = 80).

**Литература**

1. Fahy G.M., Saur J., Williams J.R. Physical problems with the vitrication of large biological systems. Cryobiology. 27. (1980). 492–510.

2. Fahy G.M. Biological eects of vitrication and devitrication. In: D.E. Pegg, A.M. Karow Jr. (Eds.). The Biophysics of Organ Preservation, Plenum Publishing Corp., New York, 1987, pp. 265–297.
3. Kroener C., Luyet B.J. Formation of cracks during the vitrication of glycerol solutions and disappearance of the cracks during rewarming. Biodynamica, 10(201), (1966), 47–52.
4. Pegg D.E., Wusteman M.C., Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. Cryobiology, 34(2), (1997), 183–192.
5. Rabin Y., Steif P.S. Thermal stresses in a freezing sphere and its application to cryobiology. ASME J. Appl. Mech., 65 (2), (1998) 328–333.
6. Rabin Y., Steif P.S. Thermal stress modeling in cryosurgery. Int. J. Solids Struct., 37, (2000), 2363–2375.
7. Rabin Y., Steif P.S., Hess K.C., Jimenez-Rios J.L., Palastro M.C. Fracture formation in vitried thin lms of cryoprotectants. Cryobiology, 53, (2006), 75–95.
8. Steiner J. Eintacher Beweis der isoperimetrischen Hauptsatze. J. reine angew Math., 18, (1838), pp.281-296.
9. Андреев А.А., Садикова Д.Г., Гахова Э.Н., Пашовкин Т.Н., Тихомиров А.М. Замерзание криозащитных растворов и выживание спермиев рыб при криоконсервации. Биофизика, (2009), т. 54, 5, с. 869-875.
10. Иванов Б.Д. Тепловое расширение гексагонального льда. Вестник ЯГУ, (2009), т.6, №4, с. 35-38.
11. Стромберг А. Г., Семченко Д. П. Физическая химия. М. Высшая школа, 1999. 527 с.

## ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА АДГЕЗИЮ НА НИХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.*

**[1]Аникеева М.О., [2]Коваленко С.Е., [2]Коваленко И.Ф., [2]Киреев В.О., [2]Гордиенко О.И.**

*[1]Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,*
*[2]Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,*
*г. Харьков, Украина*
E-mail: go.olga1787@yandex.ua

До настоящего времени основными показателями успешности криоконсервировання клеток, в частности эритроцитов, были данные о доле сохранившихся клеток, проницаемости мембран оставшихся клеток к непроникающим в норме красителям и некоторые биохимические показатели жизнедеятельности клеток. Мало внимания было уделено сохранению поверхностных клеточных структур, например гликокаликсу. Клетки млекопитающих покрыты плотным гликокаликсом, который состоит из гликолипидов, гликопротеинов и протеогликанов. Многие из этих соединений содержат гликановые цепи, заканчивающиеся сиаловыми кислотами (семья кислых 9-углеродных сахаров, заметно экспрессированных у животных). Вследствие формирования "покрытия" из гликокаликса, сиаловые кислоты распознаются и используются как места прикрепления большого количества и широкого разнообразия микробных патогенов и их токсинов. Много белков различных патогенов, соединяющихся с сиаловыми кислотами, были подробно охарактеризованы и в целом показывают высокую специфичность к разным видам сиаловых кислот и/или их связей с гликановыми цепями, лежащими в основе (Gagneux P. et al., 2003).

Бактериальные патогены адгезируют, как правило, к поверхностям эпителиальных клеток. Те же самые углеводные части рецепторов часто находятся в таких же гликосоединениях, белках или сиалогликопротеинах клеточных мембран в других местах, кроме целевой ткани. Например, эритроциты демонстрируют огромное разнообразие сложных гликопротеинов, гликосфинголипидов и ганглиозидов, которые идентичны или близки к рецепторам адгезина на эпителиальных клетках (Evans D.G., Evans D.J., 1995 ). Эритроциты человека содержат большое количество сиаловых кислот, которое вдвое превышает таковое у цыплят, лошадей и телят. Для эритроцитов человека установлено, что плотность поверхностного заряда мало варьирует в широком диапазоне ионной силы и является следствием наличия этих фиксированных анионных компонентов плазматической мембраны (Eylar E.H., et al., 1962).

Имеются отдельные данные об изменениях поверхностного потенциала клеток после замораживания-оттаивания. Например, в работе (Murga M. L. F. et al., 2000) показана связь между поверхностным потенциалом лактобактерий *Lactobacillus acidophilus* после криоконсервирования и их способностью к репарации криоповреждений и восстановлению способности к росту и образованию колоний. Показано, что поверхностный потенциал размороженных клеток может быть мерой обратимости повреждения клеток.

Таким образом, исходя из предположения, что сохранение поверхностных свойств клеток после замораживания-оттаивания, которое характеризуется, в частности, поверхностным потенциалом и связанной с этим способностью клеток к межклеточной адгезии, могут быть характеристикой успешности криоконсервирования, нами было проведено исследование влияния замораживания эритроцитов человека с различными режимами на адгезию на них микроорганизмов *Streptococcus thermophilus*.

В работе использовали лактобактерии *Streptococcus thermophilus*. Эритроциты выделяли из донорской крови человека и замораживали по трем разным режимам. Режим №1 - замораживание по методу Воротилина (Грищенко В.И., Воротилин А.М. и др., 1990), эритромассу смешивали в соотношении 1:1 с криопротекторным раствором "Пропандиосахароль", который содержал в 1000 мл раствора 370 г 1,2-пропандиола, 32 г сахарозы, 6 г хлорида натрия. Суспензию эритроцитов выдерживали в течение 5 мин, помещали в контейнеры по 2 мл и замораживали со скоростью 12-14 °С/мин. Отогревали на водяной бане при температуре 37°С. Размороженную суспензию центрифугировали при 2000 об/мин. Режим №2 – замораживание по методу Бабийчук Л.А. (Бабийчук Л.А. и др., 2000), в эритромассу, охлажденную до 0°С, по каплям добавляли охлажденный 40% водный раствор ПЭО-1500 в конечном соотношении 1:1. Суспензию помещали в контейнеры по 2 мл и замораживали погружением в жидкий азот. Отогревали на водяной бане при температуре 37°С, размороженную суспензию центрифугировали при 2000 об/мин. Режим №3 - замораживание по методу, разработанному в Институте гематологии и переливания крови (Москва) (Методические рекомендации, Москва, 1980), к эритромассе медленно добавляли консервирующий раствор "ЦНИИГПК №$11_4$", содержащий 30% глицерина, в соотношении 1:1 и выдерживали 15-20 мин. Суспензию помещали в контейнеры по 2 мл м замораживали погружением в жидкий азот. Отогревали на водяной бане при температуре 37°С, отмывали в три этапа с использованием 3-х растворов для отмывания. После третьего отмывания эритроциты, как и в первых двух случаях, ресуспендировали в физиологическом растворе на 0,1М фосфатном буфере рН 7,4.

Для определения показателя адгезии суспензии эритроцитов и лактобактерий в солевом буферном растворе смешивали в соотношении 1:1 и инкубировали при температуре 37°С в течение 30 минут. Адгезию бактериальных клеток на эритроцитах наблюдали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (масляно-иммерсионный объектив х63). В 5 разных полях зрения подсчитывали количество адгезированных бактерий на каждом эритроците и рассчитывали среднее значение – показатель адгезии.

В результате проведенных экспериментов были получены показатели адгезини лактобактерий *Streptococcus thermophilus* на эритроцитах человека, замороженных по разным режимам (таблица). Из представленных данных следует, что замораживание эритроцитов по режимам №1 (1,2-пропандиол) и №3 (глицерин) приводит к достоверному уменьшению показателя адгезии лактобактерий *Streptococcus thermophilus* на эритроцитах, тогда как показатель адгезии на эритроцитах, замороженных по режиму №2 (с ПЕО-1500) достоверно не отличается от контрольных значений.

Таблица.

Показатель адгезии бактериальных клеток *Streptococcus thermophilus* на эритроцитах человека после их замораживания-оттаивания

| Образец | Количество эритроцитов | Показатель адгезии |
|---|---|---|
| Эритроциты, замороженные с 1,2-пропандиолом | 292 | 1,31±0,87* |
| Эритроциты, замороженные с ПЭО-1500 | 104 | 1,67±0,92 |
| Эритроциты, замороженные с глицерином | 135 | 1,38±0,67* |
| Контроль | 387 | 1,91±0,96 |

Примечание: * - данные достоверно отличаются от контроля, $p<0{,}001$

Таким образом, показано, что способность клеток к межклеточной адгезии может быть чувствительной характеристикой успешности криоконсервирования и показателем сохранности поверхностных слоев клеток. В нашем случае, полученные результаты указывают на то, что эритроциты, замороженные с ПЭО-1500, лучше сохранили поверхностные свойства после замораживания-оттаивания.

**Литература**

1. Gagneux P., Cheriyan M., Hurtado-Ziola N. et al. Human-specific Regulation of α2–6-linked Sialic Acids // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, No. 48. P. 48245–48250.

2. Evans D.G., Evans D.J. Adhesion properties of *Helicobacter pilori* // Methods in Enzimology. - Academic Press, 1995. V.253. P. 336- 360.

3. Eylar E.H., Madoff M.N A., Brody O.V., Oncley J.L. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte // J. Biol. Chem.1962.Vol. 237, No. 6. P. 1992-2000.

4. Murga M. L. F., de Valdez G. F, Disalvo A. E. Changes in the Surface Potential of *Lactobacillus acidophilus* under Freeze–Thawing Stress // Cryobiology. 2000.Vol. 41.P. 10–16.

5. Грищенко В.И., Воротилин А.М. и др. Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль».

Методические рекомендации/ МЗ СССР; АН УССР; ИПКиК. Харьков. 1990. 11 с.

6. Бабійчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М. Новий метод кріоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія. 2000. Т.1, №1. С.296-298.

7. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий (Методические рекомендации). Москва, 1980. С. 7-11.

## КРИОГЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОКОМПЛЕКСОВ В ГАМЕТАХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Борончук Г.В., Балан И.В., Рошка Н.В., Бузан В.И., Казакова Ю.М., Мереуца И.Г.**

*Институт физиологии и санокреатологии АНМ, Кишинев, Молдова*

E-mail: balanion@rambler.ru

**Введение.** В стабилизации биологических структур на этапах низкотемпературного консервирования важное значение приобретают белково-липидные взаимодействия (Нардид О.А. и др., 1992). В связи с этим вызывает интерес как определение степени криоповреждений белков в зависимости от их окружения и локализации в липидном бислое, так и выяснение роли мембранных липидов в реакции клеточных структур на криовоздействие в целом.

Надмолекулярные структуры, каковыми являются белково-липидные, и в частности, белково-холестериновые комплексы образуются за счет слабых и прочных связей. При этом, белки и липиды взаимодействуют друг с другом в основном посредством слабых связей. Прочные же связи в белково-холестериновых комплексах занимают незначительное место (Наук В.А., 1991). Поэтому, целью проведенных исследований, представленных в данной работе, было определение видовых особенностей и степени сохранности указанных комплексов в процессе технологической обработки семени.

**Материал и методы исследования.** О белково-холестериновых взаимодействиях судили по устойчивости связи в белково-холестериновых комплексах.

Принцип определения устойчивости связей между белками и холестерином основан на степени разрушаемости их органическими растворителями. Биокомплексы, из которых холестерин может быть легко извлечен спиртно-эфирной смесью, относили к имеющим “рыхлую” связь между белками и холестерином. Поскольку прочносвязанные комплексы в гаметах животных не затрачиваются (Наук В.А., 1991), то они нами не изучались. Количество холестерина определяли по методу Илька (Покровский А.А., 1969) при длине волны 665 нм с помощью спектрофотометра СФ-26.

Количество рыхлосвязанного холестерина рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{AB}{CD},$$

где: $X$ - количество холестерина в мкг на 1 млрд гамет, $A$ - данные, полученные по калибровочной кривой, $B$ - кратность разбавления семени, С - концентрация гамет (млрд/мл), $D$ - объём разбавленного семени (мл).

**Результаты и их обсуждение**

Многие из биокомплексов являются образованиями неустойчивыми к действию факторов внешней среды. Поэтому в наших исследованиях было изучено содержания рыхлосвязанного холестерина, результаты которых представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Содержание рыхлосвязанного холестерина в процессе криоконсервации гамет сельскохозяйственных животных

| **Вид животного** | **Количество холестерина (мкг/1млрд) в гаметах после:** | | |
|---|---|---|---|
| | **разбавления** | **охлаждения** | **оттаивания** |
| | **M ± m** | **M ± m** | **M ± m** |
| Бык | 415,6 ± 10,9 | 379,9 ± 10,6* | 342,0 ± 10,6* |
| Баран | 428,0 ± 8,0 | 409,1 ± 12,8 | 364,9 ± 12,9* |
| Хряк | 482,0 ± 4,0 | 456,4 ± 10,4* | 424,2 ± 11,4* |

*Достоверны криогенные изменения.

Из данных табл. 1 следует, что количество рыхлосвязанного холестерина наибольшее в гаметах хряков и наименьшее - у быков.

Процесс охлаждения существенно не сказывается на концентрации рыхлосвязанного холестерина в гаметах барана, в то время, как при оттаивании имеет место снижение его содержания в гаметах всех исследуемых видов животных, но лучше количество холестерина сохраняется в гаметах хряка.

Таким образом, содержание рыхлосвязанного холестерина подвержено изменениям при оттаивании семени и они являются общими, то есть, неспецифическими для всех исследуемых видов животных.

Биохимический состав плазматических мембран представляет большой интерес для выяснения причин различной устойчивости гамет к действию низких температур (табл. 2).

Как видно из табл. 2, самое высокое соотношение белок:липид в плазматических мембранах отмечается в гаметах карпа и несколько ниже, но все же выше чем у других видов животных - у быка, гаметы которого хорошо переносят замораживание. В мембранах гамет хряка, которые характеризуются высокой чувствительностью к охлаждению и замораживанию, было обнаружено самое низкое соотношение этих компонентов. Значение этого показателя в мембранах гамет петуха и барана занимает промежуточное положение.

Видимо, уменьшение белково:липидного соотношения при оттаивании является более выгодным для сохранения функциональной полноценности, чем его увеличение, ибо семя быка и карпа в мембранах гамет которых уменьшается указанное соотношение, лучше сохраняется при криоконсервации, чем семя остальных видов животных.

Таблица 2.

Криогенные изменения соотношения белок:липид плазматических мембран гамет животных

| **Вид животного** | **Белково:липидное соотношение мембран:** | | |
|---|---|---|---|
| | **нативных гамет** | **охлажденных гамет** | **оттаянных гамет** |
| | **M ± m** | **M ± m** | **M ± m** |
| Бык | 0,43 ± 0,014 | 0,3 ± 0,11 | 0,25 ± 0,019* |
| Баран | 0,36 ± 0,031 | - | 0,52 ± 0,032* |
| Хряк | 0,17 ± 0,009 | - | 0,20 ± 0,004* |
| Петух | 0,40 ± 0,042 | 0,4 ± 0,08 | 0,52 ± 0,041* |
| Карп | 0,65 ± 0,07 | - | 0,42 ± 0,08* |

*Достоверны криогенные изменения.

Последующие исследования преследовали цель - изучить динамику изменения молярного соотношения холестерин: фосфолипиды в процессе криоконсервации гамет.

Результаты исследований показали, что соотношение холестерин:фосфолипиды было одинаковым в разбавленных гаметах быка и барана (табл. 3).

Таблица 3.

Показатели влияния технологической обработки семени на соотношение холестерин:фосфолипиды (Х:ФЛ) в гаметах быков, баранов и хряков

| Липиды | Разбавление | | Охлаждение | | Оттаивание | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Моль % M ± m | Х:ФЛ | Моль % M ± m | Х:ФЛ | Моль % M ± m | Х:ФЛ |
| **Б ы к** | | | | | | |
| Холестерин | 1,07 ± 0,04 | 0.282 | 0,99 ± 0,04 | 0,326 | 0,89 ± 0,04* | 0,382 |
| Фосфолипиды | 3,79 ± 0,06 | - | 3,04 ± 0,06* | - | 2,33 ± 0,10* | - |
| **Б а р а н** | | | | | | |
| Холестерин | 1,11 ± 0,03 | 0.281 | 1,05 ± 0,04 | 0,302 | 0,93 ± 0,05* | 0,293 |
| Фосфолипиды | 3,95 ± 0,06 | - | 3,48 ± 0,03* | - | 3,18 ± 0,03* | - |
| **Х р я к** | | | | | | |
| Холестерин | 1,25 ± 0,05 | 0.349 | 1,18 ± 0,03 | 0,375 | 1,11 ± 0,03* | 0,381 |
| Фосфолипиды | 3,58 ± 0,09 | - | 3,15 ± 0,05* | - | 2,84 ± 0,04* | - |

*Достоверны криогенные изменения.

Во время охлаждения, замораживания и оттаивания семени наблюдается тенденция к смещению молярного отношения в сторону увеличения. В гаметах быков это явление наиболее ярко выражено. Наблюдаемые изменения представляют определенный интерес, поскольку фазовый переход липидов нарушает пластичность мембран, приводя к образованию жесткой мембранной структуры, и снижению термоустойчивости клеток (Балан И.В. и др., 2006). Результаты проведенных исследований убедительно показывают, что наибольшие изменения претерпевают фосфолипиды и, что молярное отношение холестерин:фосфолипиды в гаметах изменяется в сторону единицы, особенно после оттаивания семени, то есть в направлении соотношения смягчающего фазовый переход липидов.

Следовательно, изменения соотношения холестерин:фосфолипиды, как и рыхлосвязанного холестерина, в гаметах при криоконсервации имеют неспецифический характер, то есть характер их модификации одинаков для гамет всех исследуемых видов животных.

**Выводы**

1. В процессе криоконсервации наибольшим изменениям подвергаются белково-холестериновые комплексы гамет быка.

2. Криорезистентность семени сельскохозяйственных животных может быть изменена путем введения холестерина в состав синтетических сред.

3. Белково-липидные и липид-липидные комплексы плазматических мембран гамет сельскохозяйственных животных подвергаются значительным изменениям, что свидетельствует о нарушении межмолекулярных взаимодействий в процессе криоконсервации.

**Литература**

1. Нардид О.А., Репина С.В., Дюбко Т.С. Исследование влияния замораживания–отогрева на конформацию мембраносвязанных белков методом собственной флюорисценции. Успехи современной криобиологии. Тезисы II Международ. конф. Харьков, 1992. С.124.
2. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. Кишинев: Штиинца, 1991. 200с.
3. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1969. С.159-160.
4. Балан И.В., Борончук Г.В., Тодераш И.К. Фазовые переходы в биологических мембранах в процессе криоконсервации. În: Analele ştiinţifice ale USM. Seria „Ştiinţele chimico-biologice”. Chişinău, 2006, p. 103-114.

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ (ДО 5 КДА) КОРДОВОЙ КРОВИ КРС НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРЫ МСК КМ ПОСЛЕ ЭКВИЛИБРАЦИИ С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

**Гулевский А.К., Лаврик А.А., Трифонова А.В.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*
E-mail: trifonova_ann@rambler.ru

**Введение.** При криоконсервировании мезенхимальных стромальных клеток (Fuller R., 2008), так же как и многих других типов клеток, на сегодняшний день наиболее часто используют криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО). Его преимуществом является быстрое проникновение внутрь клеток и формирование устойчивых водородных связей с жидкой фазой. Однако рядом авторов было показано, что ДМСО обладает выраженной цитотоксичностью (Пушкарь Н.С., 1978; Sperling S., 1979; Rowley S.D., 1999). Взаимодействуя с белками и липидами, он меняет структурные свойства клеточных мембран. Также, после контакта с ДМСО, происходит изменение ростовых свойств клеточных культур (Глушко Т.А., 1982; Петренко Т.Ф., 1986). В наших предыдущих исследованиях было показано, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови КРС при добавлении в среды культивирования способна стимулировать рост как нативных (Гулевский А.К., 2011), так и деконсервированных клеточных культур (Гулевский А.К., 2013), а также различные функциональные показатели фагоцитов донорской крови (Gulevsky A.K., 2001; Гулевский А.К., 2012). Целью данной работы было изучить влияние фракции (до 5 кДа) кордовой крови на ростовые свойства культуры мезенхимальных стромальных клеток после их контакта с ДМСО.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили мезенхимальные стромальные клетки, полученные из костного мозга (МСК КМ) (Owen M., 1988) лабораторных крыс. Использовали клетки на 3-4 пассажах после получения. Эквилибрацию клеток проводили при комнатной температуре (20-22$^0$C) в криопробирках в течение 30 минут в криозащитной среде, содержащей 95% FBS и 5% ДМСО. Концентрация клеток составляла $10^6$ кл/мл. После окончания эквилибрации клеточную суспензию отмывали от криопротектора средой DMEM и удаляли ДМСО с помощью центрифугирования. Культивирование МСК КМ проводили в матрасах S 75см$^2$ в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% FBS. Посевная концентрация составляла $10^4$ кл/см$^2$.

Фракцию с молекулярным весом компонентов ниже 5 кДа (ФКК) получали методом ультрафильтрации из цельной кордовой крови КРС, подвергнутой криодеструкции. Полученный объем ФКК лиофилизировали и перед применением разводили средой DMEM из расчета 40 мг/мл. ФКК добавляли в среду культивирования МСК КМ в различных концентрациях: от 28 мкг/мл до 400 мкг/мл. Контролем служил рост культуры МСК КМ без добавления ФКК.

Ростовые свойства культуры оценивали по показателям ИП (индекс пролиферации) и МИ (митотический индекс). ИП – отношение количества снятых на 3 сутки культивирования клеток к количеству посеянных, подсчитанных стандартным лабораторным методом в счетной камере Горяева. МИ – количество делящихся клеток на 1000 подсчитанных (‰), которое проводили в фиксированных на 3 сутки роста и окрашенных гематоксилином Каррачи препаратах (Блюмкин В.Н., 1973). Параллельно с МИ определяли количество патологических митозов.

Статистический анализ экспериментальных данных проводили по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Уровень достоверности составлял 0,05.

**Результаты и обсуждение.** После эквилибрации МСК КМ в криозащитной среде, содержащей 5% ДМСО, было отмечено снижение ростовых свойств культуры. ИП на 3 сутки составил 70% от ростовых показателей до эквилибрации. Причины такого значительного снижения количества МСК КМ в культуре в указанные сроки культивирования могут быть различными. Было показано, что значительное снижение жизнеспособности клеток фетальной печени происходит на этапе отмывки их от ДМСО (Скоробогатова Н.Г., 2007). Кроме того, вследствие изменений структуры плазматической мембраны под влиянием ДМСО может происходить нарушение адгезии клеток на поверхности культурального пластика. Причем нарушение может касаться не столько количественных, сколько морфологических изменений клеток. Поскольку ДМСО меняет свойства белковых компонентов мембран это может приводить к изменению свойств рецепторов адгезии – интегринов, и снижать их способность к взаимодействию как с белками внеклеточного матрикса, так и с актиновыми филаментами цитоскелета. При значительных нарушениях процессов адгезии блокируется чувствительность клетки к действию митогенов (Folkman, 1978) и, следовательно, не начинается ее митотическое деление. Более позднее начало деления клеток, взаимодействовавших с ДМСО, может быть одной из причин отмеченного снижения ростовых показателей в данном варианте. Взаимодействие ДМСО с белками и липидами мембран может приводить также к нарушению окислительного фосфорилирования, и как следствие, снижению энергетического обеспечения клеток (Петренко А.Ю., 1984; Fuller B. J., 1989; Sakurada M., 1992).

При добавлении ФКК в концентрациях 28 и 56 мкг/мл ростовой среды ИП культуры оставался достоверно ниже, чем в нативной культуре (рис.). Его нормализация наблюдалась в диапазоне концентраций ФКК 112 – 400 мкг/мл. Однако достоверные отличия от контроля после эквилибрации клеток с ДМСО были получены только в варианте с добавлением ФКК в концентрации 400 мкг/мл.

Ранее нами было показано снижение показателей роста культуры фибробластов человека и перевиваемой линии ВНК-21 после полного цикла криоконсервирования до 50% и 40% относительно нативных показателей соответственно. Как можно видеть, в результате взаимодействия клеток с ДМСО в ходе обязательной эквилибрации перед началом снижения температуры уже происходят значительные нарушения, вызывающие снижение ростовых показателей клеточных культур. Однако, в отличие от повреждений, вызванных действием низких температур, они являются обратимыми. Об этом свидетельствует тот факт, что добавление ФКК нормализует рост культуры МСК КМ после действия ДМСО, в то время как после криоконсервирования добавление ФКК в ростовые среды улучшает ростовые показатели культур, однако они остаются ниже, чем в нативных культурах (Гулевский А.К., 2013).

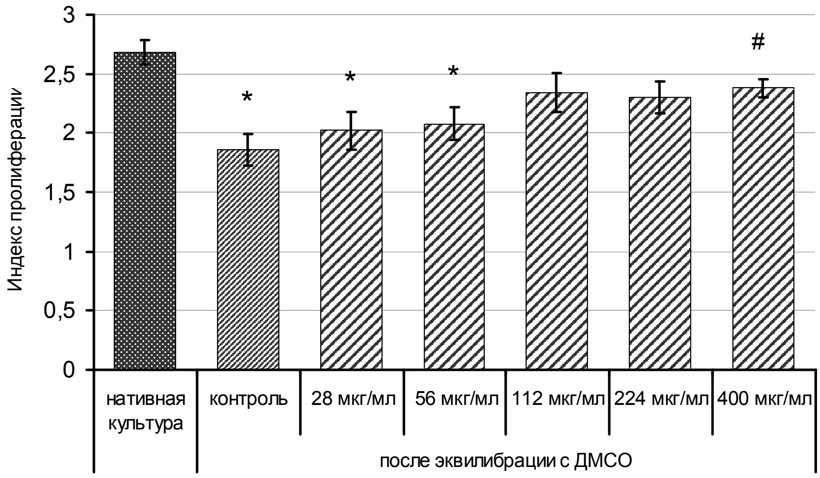



Рис. Прирост клеток на 3-и сутки роста культуры МСК КМ в средах, содержащих различные концентрации ФКК, после эквилибрации в криозащитной среде с 5% ДМСО (n = 5).

* - различия статистически достоверны по отношению к показателю нативной культуры ($p<0,05$); # - различия статистически достоверны по отношению к контролю после эквилибрации с ДМСО ($p<0,05$)

Изучение МИ, посчитанного на 3 сутки культивирования, не выявило достоверного изменения количества делящихся клеток после эквилибрации их с ДМСО или культивирования в присутствии ФКК (табл.).

Доля клеток, имеющая различные патологии деления, в культуре МСК КМ велика и может достигать 40%. В исследованные нами сроки достоверных отличий между долей патологических митозов в разных вариантах обнаружено не было. Однако визуальная оценка состояния культуры в первые часы после эквилибрации с ДМСО, его удаления и посева в культуральные флаконы выявила морфологические отличия клеток данных вариантов от нативной культуры. Это выражалось в вакуолизации ядер и цитоплазмы, изменении цитоплазменно-ядерного отношения, формы ядер и клеток. Нормализация морфологии МСК КМ наблюдалась через 24 часа культивирования. Достоверного влияния ФКК на скорость нормализации морфологии клеток и долю патологических митозов в культуре обнаружено не было.

Таблица.

Митотический индекс культуры МСК КМ на 3-и сутки роста в средах, содержащих различные концентрации ФКК, после эквилибрации в криозащитной среде с 5% ДМСО

| Вариант | Нативная культура (n = 5) | После эквилибрации с ДМСО (n = 4) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | контроль | ФКК 28 мкг/мл | ФКК 56 мкг/мл | ФКК 112 мкг/мл | ФКК 224 мкг/мл | ФКК 400 мкг/мл |
| МИ (‰) | 14,5 ± 1,04 | 11 ± 1,96 | 10,5 ± 1,08 | 11 ± 1,35 | 12,5 ± 1,55 | 14,5 ± 1,32 | 13,75 ± 1,89 |

В наших предыдущих исследованиях мы делали вывод о важной роли ФКК в среде культивирования как ростостимулирующего фактора, способного увеличивать скорость роста клеточных культур за счет ускорения протекания всех процессов адгезии клеток и активации митотического деления. Также в ряде работ мы показали прямое стимулирующее влияние ФКК на энергетический метаболизм клеток (Гулевский А.К., 2008; Гулевский А.К., 2013; Gulevskyy O.K., 2013). Очевидно, что оба эти механизма действия ФКК позволяют нормализовать нарушения в клетках, возникшие в результате взаимодействия с ДМСО на этапе эквилибрации, и восстанавливать рост культуры МСК КМ.

**Литература**

1. Блюмкин В. Н., Жданов В. М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клетки. М.: Медицина, 1973. 267 с.

2. Глушко Т. А. Особенности пролиферации клеточных культур после контакта с криопротекторами : автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” Харьков, 1983. 22 с.

3. Гулевский А. К., Грищенко В. И., Моисеева Н. Н., Абакумова Е. С., Никольченко А. Ю., Щенявский И. И., Долгих О. Л. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота. Доповіді НАН України. 2008. № 2. С.157–160

4. Гулевский А. К., Трифонова А. В., Лаврик А. А. Стимулирующее действие фракции до 5 кДа кордовой крови и “Актовегина” на рост перевиваемых культур клеток // Цитология. 2011. Т.53, №2. С. 135–141.

5. Гулевский А.К., Моисеева Н.Н., Горина О.Л., Бабийчук Л.А. Реабилитирующая среда для мононуклеарных фагоцитов после криоконсервирования // Український журнал гематології та трансфузіології. 2012. №2. С. 13-18.

6. Гулевский А.К., Трифонова А.В., Лаврик А.А. Стимуляция восстановления криоконсервированных клеточных культур фракцией (до 5

кДа) кордовой крови крупного скота или препаратом актовегин // Цитология. 2013. Т.55, № 9. С. 619-625.

7. Гулевский А.К., Ахатова Ю.С. Исследование механизма действия низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа) //Биология – XXI века: 17 Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых (21-26 апреля 2013 г.) Пущино, 2013. С.258

8. Петренко А. Ю. Особенности ионного транспорта и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс после замораживания-отогрева : автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология”. Харьков, 1984. 23 с

9. Петренко Т. Ф. Влияние криокосервирования на морфо-функциональные свойства клеток перевиваемых культур: автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” Харьков, 1986. 16 с.

10. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. Харьков, 1978. 202 с.

11. Скоробогатова Н.Г. Криоконсервирование фибробластоподобных клеток-предшественников эмбриональной печени человека : автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 “Криобиология” Харьков, 2007. 20 с.

12. Folkman J., Moscona A. Role of cell shape in growth control // Nature. 1978. V. 273, №5661. P.345-349.

13. Fuller B.J., Rubinacci A., Geboes K., De Loecker W. The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation // Cryobiology. 1989. V.26, №4. P. 333-340.

14. Fuller R., Devireddy R.V. The effect of two different freezing methods on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived stem cell // International journal of heat and mass transfer. 2008. V.51, № 23-24. P. 5650-5654.

15. Gulevsky A.K., Moiseyeva N.N., Gorina O.L. Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils // CryoLetters. 2011. V.32, №2. P. 131-140.

16. Gulevskyy O.K., Akhatova Yu.S., Sysoev A.A., Sysoeva I.V., Nikolchenko A.Yu., Shchenyavsky I.I. Influence of Lyophilized Low-Molecular (below 5 kDa) Fraction from Cord Blood Cryohemolysate on ATP Content in Native and Cryopreserved Leukocytes//the International Conference of the Society for Low Temperature Biology (October 6 to 9, 2013) Hannover, Germany. 2013. P.70.

17. Owen M. Marrow stromal stem cells // J. Cell Science Suppl. 1988. №10. С. 63-76.

18. Rowley S.D., Feng Z., Yadock D., Holmberg L., Macleod B., Heimfeld S. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade // Cytotherapy. 1999. V.1, №6. P. 439-446.

19. Sakurada M, Okochi N, Kato H, Satomi S, Sasaki T, Taguchi Y, Mori S. Mitochondrial energy synthesis during cold preservation and after reperfusion in liver transplantation // Nihon Geka Gakkai Zasshi. 1992. V. 93, №7. P. 709-715.

20. Sperling S, Larsen IG. Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium in vitro // Acta. Ophthalmology (Copenh). 1979. V.57, №5. P. 891-898.

## CHARACTERIZATION OF ERYTHROCYTE MEMBRANE PERMEABILITY BY OSMOTIC SHOCK: QUANTITATIVE EFFECTS OF INITIAL CRENATION ON FRAGILITY AND DATA ANALYSIS

**Denysova Olga,[1] Vodopyanova Larisa ,[2] Zhegunov Gennadiy,[1] Nitsche[3] Johannes M.**

[1]*Department of Biochemistry, Kharkov State Veterinary Academy, Mala Danilovka, Dergachy district, Kharkov region, Ukraine*

[2]*Department of Physiology and Pathophysiology, Kharkov State Veterinary Academy, Mala Danilovka, Dergachy district, Kharkov region, Ukraine*

[3]*Department of Chemical and Biological Engineering, University at Buffalo, The State University of New York, Buffalo, NY, USA*

E-mail: denisova78@mail.ru

**Introduction and Motivation.** Insofar as cryoprotectants must enter erythrocytes to be effective, quantification of the membrane permeability coefficient $P$ for these molecules has long been key to the mechanistic understanding of their function (Baust J. G., 2007). This poster addresses an important question relating to permeability determinations by osmotic shock, in which: (i) crenation occurs essentially instantaneously upon immersion of erythrocytes in a concentrated cryoprotector solution, followed by slow membrane penetration of the cryoprotector over a specific period $\Delta t$, and (ii) swelling occurs upon subsequent removal of the erythrocytes and immersion in fresh saline. Hemolysis results if $\Delta t$ was long enough for so much cryoprotector to have entered that the final osmotically equilibrated cell volume exceeds the mechanical threshold of the membrane. Data on percent hemolysis as a function of $\Delta t$ ultimately yields $P$ as a fitted parameter in a supporting theoretical model.

Classical approaches rely on a separate osmotic fragility experiment to determine the critical (threshold) volume at which 50% of erythrocytes hemolyze

(Mazur P, 1974). The permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperature. However, cells that have first undergone crenation in the osmotic shock experiment would likely to be more fragile than the fresh cells used to assess fragility. Indeed, it is difficult to guess a priori the consequences of so heavily wrinkling the membrane and its supporting cellular structures. We quantify this phenomenon, and find that the initial crenation renders erythrocytes significantly more fragile. Thus, the critical volume applicable to the actual osmotic shock experiment is smaller than usually determined separately. This fact calls for a reanalysis of osmotic shock-based determinations of RBC membrane permeability.

**Overview of Experiments.** Osmotic fragility was assessed for bovine erythrocytes that experienced the same type of crenation as in osmotic shock experiments used to measure permeability. The two cases considered were crenation caused by initial suspension of erythrocytes in the following hyperosmotic solutions: (A) PBS with 1.0 M glycerol; and (B) PBS with 0.25 M DMSO. Hemolysis occurred upon subsequent re-suspension of the erythrocytes in NaCl solutions of various concentrations. The raw data reported and analyzed comprise the fraction of erythrocytes hemolyzed as a function of NaCl solution concentration in which they were re-suspended. The nine data sets shown below as an example were measured at 10 ϵC. Crenation occurred for the five data sets marked with arrows, because the erythrocytes were initially suspended in PBS with 1.0 M glycerol (hyperosmotic).

These erythrocytes fragilized by crenation could withstand re-suspension in only hypertonic and moderately hypotonic saline solutions. Crenation did not occur for the remaining four data sets representing control experiments, because the erythrocytes were initially suspended in pure PBS (~isotonic). The undamaged erythrocytes could withstand re-suspension in more hypotonic saline solutions.

**Experimental Methods**

**Materials.** Glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) from Fluka (Switzerland) was used without further purification. Bovine blood was obtained from the jugular vein usually on the day of the experiment, and stored no more than 48 hours at 5°C until use (typically a few hours). All manipulations of animals were carried out in accordance with international principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Concentrated erythrocyte suspensions (hematocrit ~95% cells by volume) for all experiments were obtained by centrifugation at 350 g and resuspension (3x) in fresh isotonic phosphate-buffered saline.

**Assessment of osmotic fragility.** Crenated erythrocytes were generated by adding 0.5 ml of the concentrated erythrocyte suspension to 4.5 ml of isotonic

PBS with either 1.0 M glycerol or 0.25 M DMSO, and allowing the mixture to sit for ~1 min, before immediate re-centrifugation. 0.2 ml aliquots of the re-centrifuged suspension were then pipetted into 1.8 ml of saline solutions with various concentrations of NaCl ranging from 0.4% to 1.4% (w/v). In control experiments, the first step used 4.5 ml of isotonic PBS without any glycerol or DMSO.

**Determination of percentage hemolysis.** Absorbance of the resulting erythrocyte suspensions was measured at 543 nm, reflecting hemoglobin in the extracellular solution from disrupted cells. Division by the absorbance of a fully hemolyzed suspension from the same blood sample yielded the fraction of cells hemolyzed. The following figure shows increasing amounts of hemoglobin released in solutions of decreasing NaCl concentration proceeding from left to right.

**Analysis of Data.** A mathematical model of the mixing steps described above was developed and coded in Fortran. It yields the final erythrocyte volume $V$ (after osmotic equilibration with the saline solution used to assess fragility) as a function of the NaCl concentration of this solution. The symbol $V$ is taken to represent the total erythrocyte volume (internal solution plus excluded volume).

The data analysis is based on a cumulative probability distribution giving the fraction of cells hemolyzed $f$ as a function of the total cell volume $V$, for which a reasonable functional form is

$$f = \begin{cases} 0 & \text{for } \alpha < 0, \\ 3\alpha^2 - 2\alpha^3 & \text{for } 0 < \alpha < 1 \quad \text{where } \alpha = (V - V_{min}) / (V_{max} - V_{min}), \\ 1 & \text{for } \alpha > 1. \end{cases}$$

The parameters $V_{min}$ and $V_{max}$ signify, respectively, the erythrocyte volumes at which hemolysis starts to occur and is complete. This fragility distribution incorporates the simplest polynomial expression capable of representing the smooth S-shaped transition from zero to complete hemolysis. The distribution is symmetric in the sense that 50% hemolysis ($f = 0.5$) occurs at volume a so-called critical volume $V_c$ equal $(V_{min} + V_{max}) / 2$.

The computed relationship between $V$ and NaCl concentration allows the computer code to generate the result that is measured experimentally, namely the curve giving the fraction of erythrocytes hemolyzed $f$ as a function of NaCl concentration. For each measured data set, the code searches for the values of $V_{min}$ and $V_{max}$ that minimize the error between experimental and theoretical values of $f$ summed over all points in the data set. The best-fit values of $V_{min}$ and $V_{max}$ are reported as percentages of the native erythrocyte volume, taken to be 58 $mm^3$ (Mazur et al. (1974)).

The current model does not account for the centrifugation step between the initial crenation and the subsequent re-suspension of erythrocytes in saline.

Thus, the results reported should be regarded as preliminary. This discrepancy between model and experiment would cause errors of ~10%. Thus, the final results will not differ much from those reported here.

**Results.** The following table shows the fitted values of $V_{min}$ and $V_{max}$ averaged over all data sets for both solutes (1.0 M glycerol and 0.25 M DMSO) at the two or three temperatures studied for each (0 єC, 10 єC or 37 єC). Three out of 33 data sets were discarded because the number of measured points (two or three) was insufficient for a meaningful determination of $V_{min}$ and $V_{max}$.

| Temperature (°C) | Results for 1.0 M glycerol | | Results for 0.25 M DMSO | | Control | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $V_{min}$ (% of native volume) | $V_{max}$ (% of native volume) | $V_{min}$ (% of native volume) | $V_{max}$ (% of native volume) | $V_{min}$ (% of native volume) | $V_{max}$ (% of native volume) |
| 0 | 63 | 87 | 84 | 116 | 103 | 149 |
| 10 | 74 | 92 | | | 107 | 135 |
| 37 | 67 | 87 | 97 | 109 | 110 | 159 |
| Mean over all temperatures | 68 | 89 | 91 | 113 | 105 | 146 |

**Discussion.** According to that last two columns of the preceding table, control erythrocytes undergo hemolysis between 105% and 146% of the native volume. The implied critical volume $V_c$ at which half of erythrocytes are hemolyzed is ~125% of the native volume. Mazur et al. (1974) found $V_c$ to be 155% of the native volume, reckoned in terms of water volume as opposed to the total volume used here. Their result corresponds to 139% based on total volume. Thus, our control erythrocytes are somewhat less robust, but the results are broadly comparable.

The final results show clearly that crenation increases erythrocyte fragility. This finding has the important implication that fragility experiments with fresh erythrocytes do not furnish a good basis for determining the critical volume for analysis of permeability experiments using the osmotic shock method. This effect may be responsible for Mazur et al.'s (1974) finding that their permeabilities determined by osmotic shock come out systematically somewhat higher than by the alternate method of hypertonic hemolysis. Ongoing work in our laboratories is revisiting such permeability determinations corrected for the increased fragility caused by the initial crenation.

**Литература**

1. Baust J. G. Advances in biopreservation / Baust J. G, Baust J. M. // Ed. by - By Tayloor & Francis Group. LLC. 2007. P. 15 -62.

2. Mazur P. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures / P. Mazur , S.P. Leibo, R.H. Miller // J Membr Biol. 1974. Vol. 15(2). P. 107-136.

## ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ, ДОДЕЦИЛ -B-D-МАЛЬТОЗИДА И ТЕМПЕРАТУРЫ 49°C

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

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

E-mail: starling_nataly@mail.ru

В настоящее время одной из актуальных проблем криобиологии является исследование механизмов повреждения и защиты клеток при замораживании. Замораживание биологических объектов сопровождается значительными изменениями физико-химических условий среды клетки. Предполагают, что основными причинами повреждения эритроцитов при замораживании является изменение температуры и связанное с вымерзанием воды концентрирование внеклеточного раствора (Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994, Pegg D.E., Diaper M.P., 1998). В качестве экспериментальной модели для изучения влияния высоких концентраций солей на клетку используют гипертонический стресс (ГС). Гипертонический стресс эритроцитов представляет собой явление повреждения клеток, перенесенных в гипертоническую среду при постоянных положительных значениях температуры.

Известно, что от состояния цитоскелет-мембранного комплекса зависит характер ответа клетки на действие стрессовых факторов (Белоус А.М., 1990). Инкубация эритроцитов млекопитающих при 49°C приводит к изменению состояния цитоскелетных белков, в частности спектрина (Law R. et al., 2003, Mosior M. et al., 1990).

Амфифильные соединения могут повышать устойчивость эритроцитов человека к различным стрессовым факторам, что, по всей видимости, обусловлено их способностью встраиваться в эритроцитарную мембрану и модифицировать ее (Шпакова Н.М. и др. 1995). Это позволяет предположить, что амфифильные соединения могли бы снижать уровень гемолиза эритроцитов различных видов млекопитающих в условиях гипертонического стресса.

В данной работе были выбраны амфифильные соединения имеющие одинаковую гидрофобную часть молекулы (алкильная цепь длиной 12 углеродных атомов), и отличающиеся гидрофильной группой. Додецилсульфат натрия (С12) имеет отрицательно заряженную гидрофильную часть (сульфатная группа, несущая отрицательный заряд), а додецил-β-D-мальтозида (ДМ) – не имеем заряда, гидрофильная часть представлена соединенными эфирной связью остатками молекул глюкозы.

В связи с этим представляло интерес исследовать влияние модификации цитоскелета клеток под действием температуры 49°С на чувствительность эритроцитов лошади и кролика к ГС и оценить эффективность додецилсульфата натрия и додецил-β-D-мальтозида в указанных условиях.

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови лошади (Equus caballus) и кролика (Oryctolagus cuniculus), заготовленной на консерванте «Глюгицир».

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли путем переноса аликвоты суспензии эритроцитов в 1 мл раствора, содержащего 4,0 моль/л NaCl, на 5 мин при температуре 37 или 0°С. Амфифильные соединения добавляли в гипертоническую среду перед внесением в нее клеток (Шпакова Н. М. и др., 1995). Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100% принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон Х-100 (0,1%).

Антигемолитическую активность амфифильного соединения выражали как снижение гемолиза клеток в присутствии веществ по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил в процентах.

Модификацию цитоскелета эритроцитов млекопитающих (гематокрит 25%) осуществляли путем инкубирования клеток при температуре 49°С в течение 10 мин.

Для изучения гипертонической чувствительности эритроцитов млекопитающих клетки переносили в среду, содержащую 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 и 0°С.

Исходный уровень повреждения эритроцитов лошади в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при 37°С составляет 60%. При снижении температуры среды до 0°С устойчивость данных клеток к гипертоническому стрессу возрастает, т.к. уровень лизиса эритроцитов лошади составляет 15%.

Эритроциты кролика в отличие от клеток лошади проявляют высокую устойчивость к гипертоническому стрессу как при 0°С, так и при 37°С, причем уровень их повреждения фактически не зависит от температуры (при 37°С уровень гемолиза составляет 16%±5, при 0°С – 20%±5).

Высокая устойчивость эритроцитов кролика к гипертоническому воздействию (при 37°С) может быть связана с очень высокой проницаемостью мембран данного вида млекопитающих для воды. Диффузионная водная проницаемость эритроцитов кролика при этой температуре составляет $10{,}7 \times 10^{-3}$ см/сек, что почти в 2 раза выше по сравнению с эритроцитами других видов млекопитающих (Benga G. et al., 1993). Высокая водная проницаемость мембраны обеспечивает быстрый отток воды из эритроцитов кролика при помещении их в гипертоническую среду, что позволяет уменьшить осмотическую нагрузку на клетки и, как следствие, повреждающее действие гипертонического раствора.

Модификация цитоскелета эритроцитов лошади при 49°C приводит к значительному снижению чувствительности клеток к гипертоническому воздействию при 37°C, в то время как при 0°C эффект модификации не проявляется. В результате модификации цитоскелета эритроцитов кролика при 49°C наблюдается увеличение уровня гемолиза клеток по сравнению с контролем (более чем на 30%) при обоих температурных режимах.

При использовании амфифилов в условиях ГС эритроцитов лошади при температуре 37°C высокую антигемолитическую активность проявляет ДМ (более 70%), С12 менее эффективен (42%). При 0°C эффективность данных веществ не выявлена.

Предварительное инкубирование эритроцитов лошади при 49°C приводит к снижению антигемолитической активности С12 и ДМ на 40-50% в условиях ГС при 37°C.

Используемые амфифильные соединения не оказывают защитного действия на эритроциты кролика в условиях ГС при обоих температурных режимах.

Антигемолитический эффект амфифильных соединений обусловлен способностью их молекул при встраивании в эритроцитарную мембрану разупорядочивать ее структуру и препятствовать развитию трансмембранных дефектов до размера гемолитических пор (Шпакова Н.М. и др. 2010). Встраивание и распределение экзогенных амфифильных молекул в значительной степени определяется их физико-химическими свойствами и состоянием эритроцитарной мембраны. Можно предположить, что отсутствие защитного действия амфифильных соединений в отношении эритроцитов кролика может быть связано с высоким содержанием холестерина в эритроцитарных мембранах данного вида, что затрудняет реорганизацию мембраны при встраивании в нее амфифилов. Снижение эффективности амфифильных соединений в условиях ГС после инкубирования клеток при температуре 49°C может быть обусловлено изменением состояния мембран модифицированных клеток, поскольку термическая модификация увеличивает вязкость мембран эритроцитов и уменьшает их текучесть (Mosior M. et al., 1990, Kucera W. et al., 1986). Таким образом, модификация клеток при 49°C может оказывать на мембрану действие, противоположное эффекту амфифилов, повышая жесткость бислоя. Это приводит к снижению способности амфифилов при встраивании в мембрану разупорядочивать ее, что проявляется в снижении антигемолитической активности веществ.

**Литература**

1. Белоус А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко К.: Наукова думка, 1994. 432 с.
2. Белоус А. М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология. 1990. №3. С. 3-12.
3. Pegg D. E., Diaper M. P. On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes // Biophys. J. 1998. Vol. 54, № 3. P. 471-488.
4. Law R., Liao G., Harper S. et al. Pathway shifts and termal softening in temperature-coupled forced unfolding of spectrin domains // Biophys. J. 2003. Vol. 85, № 5. P. 3286-3293.
5. Mosior M., Bobrowska M., Gomulkiewicz J. Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erithrocytes // Biochim. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1022. P.355-360.
6. Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гипертоническом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия. 1995. Т. 60, № 10. С. 1624-1631.
7. 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 ciniculus) // Comp. Biochem. Physiol. 1993. Vol. 106 B, № 2. P. 281-285.
8. Шпакова Н.М., Писаренко Н.А., Нипот Е.Е. Влияние алкилсульфатов на гипертонический гемолиз эритроцитов млекопитающих // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини (збірник наукових праць). 2010. Випуск 21, частина 2, том 2.- С. 89-96.
9. Kucera W., Meier W., Lerche D. Influence of heat-induced changes in the mechanical properties of the membrane on the filterabiliti of human erythrocytes // Biomed Biochim Acta. 1986. Vol. 45, № 3. P. 353-358.

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ СА$^{2+}$-АТРазы, ЛИПИДНОЙ АСИММЕТРИИ И МЕХАНИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КРИОПРОТЕКТОРА ПЭГ-1500

**Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А.**

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

E-mail: nina_zemlya@mail.ru

Криоконсервирование клеточных суспензий является важным элементом различных биотехнологических процессов. В частности, замораживание эритроцитов человека для клинического применения позволяет решить ряд существенных проблем в практике гематологии и трансфузиологии. Для стабилизации клеток при низкотемпературных воздействиях используют эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы, которые реализуют защитные свойства, проникая в клетки или, соответственно, оставаясь во внеклеточной среде. В настоящее время использование экзоцеллюлярных соединений весьма ограничено, что в определенной степени связано с их недостаточной изученностью. Применение экзоцеллюлярных криопротекторов могло бы существенно облегчить технологические манипуляции после отогрева клеточных суспензий, позволяя не отмывать криопротектор при условии его низкой токсичности. Защитное действие криопротекторных соединений связывают, прежде всего, с модификацией физико-химических свойств среды и изменением характера кристаллизации жидкой фазы. Вместе с тем все криопротекторы вызывают значительные структурные и функциональные изменения в клетках, которые могут способствовать их выживанию в стрессовых условиях, сопряженных с процессами замораживания и отогрева. Плазматические мембраны крайне чувствительны к воздействиям факторов внешней среды. В связи с этим исследования изменений мембранных компонентов, вызванных криопротекторными средами и низкотемпературными сдвигами, могут способствовать пониманию механизмов, определяющих устойчивость клеток к стрессам криоконсервирования и последующую стабильность клеток при реактивации в физиологических условиях.

Цель работы состояла в изучении влияния экзоцеллюлярного криопротектора полиэтиленгликоля с м.м.1500 (ПЭГ-1500) на структурно-функциональное состояние плазматической мембраны эритроцитов, в частности, на активность $Ca^{2+}$-ATP-азы, асимметричное распределения фосфатидилсерина (ФС) в мембране, а также определение устойчивости эритроцитов к механическому стрессу в присутствии данного криопротектора.

**Методы исследования**. Эритроциты крови взрослых доноров отмывали от плазмы и лейкоцитарных компонентов. Выделение мембран эритроцитов проводили по методу (Fairbanks G. et al., 1971). Белые тени замыкали в течение 30 мин при 37°C в растворе идентичном среде, используемой для определения ферментативной активности $Ca^{2+}$-ATPазы (Покудин Н.И. и др., 1988). Состав среды включал: 135 мМ KCl, 10 мМ трис, 10 мМ HEPES (pH 7,4), 0,037 мМ $MgCl_2$, 4 мМ ATP, 1 мМ EGTA и необходимые концентрации $CaCl_2$, добавляемые из расчета содержания свободного $[Ca_i^{2+}]$ на уровне $(2\text{-}4)\cdot 10^{-6}$ М (MAXChelator, http://

www.standford.edu). В часть проб $Ca^{2+}$ не добавляли. Затем 100 мкл замкнутых теней соединяли с равными объемами растворов, содержащих различные концентрации ПЭГ-1500, и инкубировали в течение 20 мин при 37 или 5 °С. Активность $Ca^{2+}$-АТРазы определяли по разнице накопления неорганического фосфора ($P_i$) в $Ca^{2+}$-содержащей и безкальциевой средах по методу (Rathbun W.B., Betlach M.V., 1969).

Экспонирование ФС на поверхности эритроцитов оценивали по связыванию анексина V-FITC с клетками методом проточной цитометрии (FACS Calibur, Becton Dickenson, США). Для этого 200 мкл эритроцитов, разведенных до концентрации $10^7$ клеток/мл, соединяли с равным объемом раствора 30% ПЭГ, приготовленного на основе анексин-связывающего буфера, и инкубировали клетки в течение 1 часа или в течение 1 суток при 37 °С. Затем добавляли 5 мкл анексина V-FITC и после 15 минутного инкубирования в темноте проводили измерения.

Механическую чувствительность оценивали по уровню гемолиза в суспензии эритроцитов, подвергнутых стрессу в присутствии вращающихся пластиковых шариков диаметром 5 мм при комнатной температуре в течение 1 часа (Шпакова Н. М. и др.., 2010). Клеточные суспензии были приготовлены с гематокритом 20% в средах, содержащих разные концентрации ПЭГ-1500.

Во всех экспериментах растворы ПЭГ-1500 при всех исследуемых концентрациях содержали 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4. Результаты статистически обработаны с использованием программы Statgraphics plus 2.1 for Windows. Различия между средними значениями выборок считали статистически значимыми при уровне значимости $P<0,05$.

**Результаты и обсуждение.** На рис.1 показаны изменения активности $Ca^{2+}$-АТРазы эритроцитов под влиянием нарастающих концентраций ПЭГ-1500 в среде. При разных температурах характер этих изменений неодинаков. Добавление даже небольших концентраций криопротектора в среду при 37 °С ведет к ингибированию $Ca^{2+}$-АТРазной активности. В присутствии значительных концентрациях полимера (20–30%), которые способны оказывать выраженное криопротекторное действие, было отмечено снижение скорости накопления $P_i$ примерно в 3 раза. В гипотермических условиях ферментативная активность $Ca^{2+}$-насоса резко падает и становится нечувствительной к изменению содержания криопротектора в среде. Очевидно, что слабая активность $Ca^{2+}$- АТРазы при низкой температуре обусловлена термодинамическими причинами. Причины инактивации $Ca^{2+}$-АТРазы в присутствии ПЭГ при физиологической температуре могут быть связаны с осмотическим сжатием клеток в гипертонической криопротекторной среде и дегидратирующими эффектами данного соединения в отношении макромолекул, формирующих мембрану. Действительно, ПЭГ является сильным гигроскопическим полимером и вызывает дегидратацию головных групп фосфолипидов, что сказывается на структуре липидного бислоя и сопровождается последующей сепарацией липидов (Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K., 1995). Изменение фазового состояния липидного микроокружения $Ca^{2+}$-АТРазы может быть одной из основных причин снижения ее активности в присутствии ПЭГ. Поскольку способность $Ca^{2+}$-насоса транспортировать ионы $Ca^{2+}$ определяется, прежде всего, его каталитической активностью, можно ожидать повышения уровня внутриклеточного $Ca^{2+}$ в эритроцитах, инкубированных в ПЭГ-содержащих растворах. Кроме того, повышению уровня внутриклеточного $Ca^{2+}$ в эритроцитах под влиянием ПЭГ-1500 может способствовать изменение скорости входа $Ca^{2+}$ в клетки, что было продемонстрировано в присутствии изотонического раствора ПЭГ-1500 (Kucherenko Y.V., Bernhardt I., 2006). Ионы $Ca^{2+}$, обладающие функцией вторичного мессенджера, несомненно играют важную роль в выживании клеток в стрессовых условиях. Вместе с тем они могут запускать каскадную цепь событий программной клеточной смерти – апоптоз, одним из основных признаков которого является экспонирование ФС на внешней поверхности мембраны.

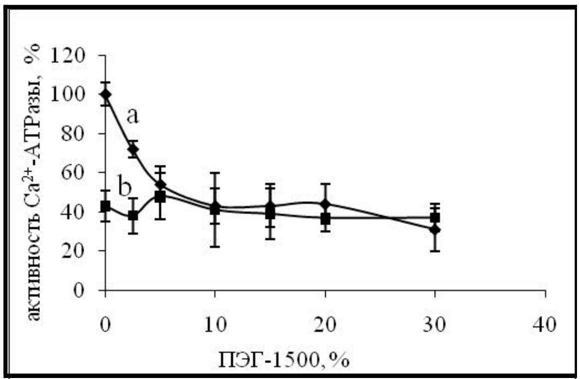



Рис.1. Изменение активности $Ca^{2+}$-АТРазы реконструированных эритроцитов в зависимости от концентрации ПЭО-1500 при 37 (a) и 5 (b) $^{o}$C. Все значения достоверно отличаются от контроля (37 $^{o}$C) с уровнем значимости $P<0,001$

Известно, что фосфолипиды в плазматической мембране эритроцитов располагаются асимметрично. Большая часть фосфатидилхолина и сфингомиелина находятся во внешнем монослое, а фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин практически полностью сконцентрированы во внутреннем липидном монослое. Повышение уровня внутриклеточного $Ca^{2+}$ может стимулировать активность АТР-независимого фермента скремблазы и запускать процесс скремблинга, в результате которого происходит перемешивание фосфолипидов между внешним и внутренним липидными монослоями. Кроме того, при росте уровня внутриклеточного $Ca^{2+}$ отмечается сопутствующее ингибирование ATP-зависимого фермента флиппазы, ответственной за возврат аминофосфолипидов во внутренний липидный монослой. Вследствие комбинированной модификации активности данных ферментов нарушается трансмембранная асимметрия фосфолипидов и ФС оказывается на внешней поверхности мембраны, что не характерно для нормального физиологического состояния.

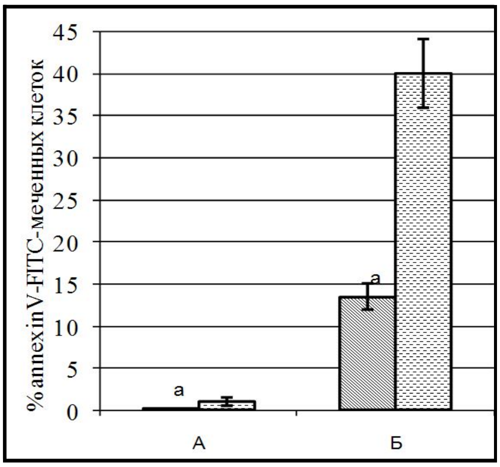



Рис.2.Изменение ассиметричного распределения ФС в эритроцитах, экспонированных в ПЭГ-содержащей среде при 37°C: А – эритроциты, экспонированные в физиологической среде в течение 1 часа (а) и 24 часов (б); Б-экспонирование эритроцитов в ПЭГ-содержащей среде в течение 1 часа (а) и 24 часов (б). Все значения достоверно отличаются от контроля с уровнем значимости $P<0{,}001$.

Исходя из установленного факта снижения активности $Ca^{2+}$-АТРазы в эритроцитах под влиянием ПЭГ-содержащих растворов, вполне очевидным предположением дальнейшего развития событий является возможность нарушения асимметрии липидов плазматической мембраны. Как видно на рис. 2 влияние ПЭГ на структуру липидного бислоя заметно уже при его кратковременном контакте с эритроцитами. После 1 часа инкубирования количество клеток экспонирующих ФС на поверхности мембраны составляло 12-15%, а спустя 24 часа – увеличивалось до 40%. Причины, которые вызывают трансмембранное перераспределение ФС, могут быть связаны как с влиянием данного соединения на липидный бислой, так и с изменениями в состоянии других субклеточных систем вызванных процессами дегидратации. Картина, выявленная в ходе исследования асимметричного трансмембранного распределения ФС, отражает возможность формирования дефектов на этапе, предшествующем замораживанию при длительном контакте клеток с криопротектором. Возможно, развитие данных процессов может быть связано с повышением уровня цитозольного $Ca^{2+}$ вследствие осмотического сжатия клеток в гипертонической криопротекторной среде и ингибирования активности $Ca^{2+}$-АТРазы.

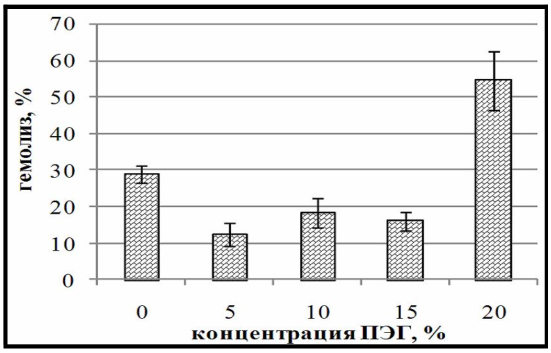



Рис.3.Влияние различных концентраций ПЭГ в криопротекторной среде на гемолитическое повреждение эритроцитов человека при механическом стрессе: Все значения достоверно отличаются от контроля с уровнем значимости $P<0,05$

В связи с этим при разработке безотмывочных способов криоконсервирования эритроцитов с использованием экзоцеллюлярных криопротекторов необходимо учитывать возможность неблагоприятных эффектов на клетки связанных с повышением уровня $Ca^{2+}$ и увеличением экспонирования ФС на поверхности клеток. Возможно, для повышения стабильности клеток криоконсервированных с использованием экзоцеллюлярных криопротекторов эффективными могут оказаться различные биохимические добавки, препятствующие развитию $Ca^{2+}$-индуцируемых изменений в клетках. Кроме того, сокращение времени контакта клеток с криопротекторной средой, возможно также будет иметь положительный эффект на жизнеспособность клеток после размораживания.

Вместе с тем, снижение активности $Ca^{2+}$-АТРазы в присутствии ПЭГ-1500 и возможное увеличение уровня внутриклеточного $Ca^{2+}$ могут способствовать повышению резистентности эритроцитов к действию факторов, сопровождающих процессы низкотемпературного консервирования. Данное предположение базируется на результатах исследования состояния мембрано-цитоскелетного комплекса в присутствие $Ca^{2+}$ методом атомно-силовой микроскопии (Liu F. et al., 2005). Показано, что рост уровня $Ca^{2+}$ в клетке определяет повышение жесткости мембраны и цитоскелета, что может увеличивать механическую устойчивость эритроцитов. Механическая стабильность клеток может способствовать выживаемости в условиях замораживания-отогрева, когда формирующаяся твердая фаза системы или образующиеся кристаллы льда оказывают определенное давление на мембранные структуры. Поэтому важно понять, как модификация структурно-функционального состояния отдельных мембранных компонентов в присутствии криопротектора обеспечивает формирование физических свойств, обеспечивающих стабильность клетки при возрастающих механических воздействиях.

Оценка уровня гемолиза эритроцитов при механическом стрессе, обусловленном движущимися в суспензии пластиковыми шариками, показала, что добавление ПЭГ-1500 в среду действительно способствует снижению повреждения клеток. Как видно на рис. 3 стабилизирующее действие ПЭГ зависит от концентрации. Данное соединение стабилизирует эритроциты в концентрационном диапазоне 5–15%, однако дальнейший рост его концентрации вызывает резкое повышение гемолиза при механическом стрессе относительно контрольных значений. Наиболее вероятными причинами стабилизации эритроцитов к механическому стрессу в присутствии ПЭГ-1500, по-видимому, является влияние данного соединения на структурное состояние отдельных субклеточных систем. В частности, повышение механической стабильности эритроцитов может быть обусловлено ростом уровня внутриклеточного $Ca^{2+}$, вызванного снижением активности $Ca^{2+}$-АТРазы и возможным повышением жесткости мембраны и цитоскелета в данных условиях. Таким образом, увеличение механической стабильности эритроцитов человека под влиянием ПЭГ можно рассматривать как отражение модификации физических свойств мембраны, опосредованной изменениями функционирования отдельных субклеточных систем в присутствии криопротектора. Повышение механической устойчивости может, в определенном смысле, рассматриваться в качестве составного элемента защиты клеток в процессе замораживания-отогрева, т. е. быть одним из возможных факторов способствующих выживаемости клеток в условиях криоконсервирования. Вместе с тем полученные данные могут отражать способность данного соединения стабилизировать эритроциты к стрессовым воздействиям различного типа на основе общих принципов.

Таким образом, результаты проведенных исследований на примере эритроцитов подтверждают предположение о важной роли структурно-функциональных изменений мембранных компонентов под влиянием криопротекторов в выживаемости клеток в процессе криоконсервирования. При этом изменение концентрации $Ca^{2+}$ могут способствовать стабилизации клеток к стрессовым воздействиям или быть фактором, дестабилизирующим клетки после размораживания, когда появляется возможность реализации во времени тех метаболических и биохимических реакций, триггером которых был рост концентрации $Ca^{2+}$ на любом из этапов криоконсервирования. В связи с этим роль $Ca^{2+}$-зависимых изменений в клетках, как факторов влияющих на стабильность клеток в условиях стресса, заслуживает дальнейшего изучения.

### Литература


1. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F. //Biochemistry. 1971. V.10, №13. - P. 2606-2617.

2. Покудин Н.И., Петруняка В.В., Орлов С.Н. // Биохимия.1988.V. 53, № 5. - С. 753 - 758.

3. Rathbun W.B., Betlach M.V. // Anal Biochem. 1969. V.28, №1. P. 436-445.

4. Шпакова Н. М., Орлова Н. В., Александрова Д. І. Патент 52701 Україна, МПК G 01 N 33/48. (2010) // Бюл. № 17.

5. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. // Biophys. J. 1995. V.68, №2. P. 525-535.

6. Liu F., Mizukami H., Sarnaik S., Ostafin A. // J. Struct. Biol. 2005. v.150, №2. P. 200-210.

7. Kucherenko Y.V., Bernhardt I. // Ukr. Biokhim. Zh. 2006. V.78, №6. P. 46-52.


## ОСМОТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК СПЭВ В ГИПЕРТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ NaCl


**Коваленко И.Ф., Коваленко С.Е., Розанов Л.Ф.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины*

E-mail: ikovalenki@rambler.ru


В настоящее время можно с уверенностью утверждать, что в процедуре криоконсервирования с использованием медленного замораживания одним из основных факторов криоповреждения является осмотический стресс. Осмотический стресс может индуцировать повреждение клеток, способствуя образованию в мембране пор или зон с аномально высокой проницаемостью (Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. 1994). Вместе с тем, динамика и особенности повреждений клеток при действии на них гипертонии изучены недостаточно полно. Ответ на некоторые из вопросов, связанных с динамикой пертурбаций мембранных структур под действием факторов криоповреждения, может дать изучение кинетики осмотических реакций клеток в гипертонических растворах проникающих и непроникающих веществ методом вольюмометрии. Основной трудностью, которая возникает при использовании этого метода, является смещение клеток потоком жидкости при замене одной среды на другую, вследствие чего наблюдение за изменением объема каждой конкретной клетки становится проблематичным. Использование в качестве объекта исследования клеток на начальных фазах культивирования для визуального наблюдения за кинетикой обезвоживания или оводнения может быть перспективным.

Исследования проведены на клетках перевиваемой культуры СПЭВ (эмбриональная почка свиньи), полученной из коллекции НПО «Биолек».

Клетки культивировали в пластиковых флаконах фирмы Costar в среде 199 (Австрия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят (Австрия) при 37°С в воздушной среде, обогащенной 5% $CO_2$. Пересев клеток проводили 1 раз в неделю. В суспензионное состояние клетки переводили путем обработки монослоя клеточной культуры смесью 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена в соотношении 1:5. В экспериментах использовали клетки СПЭВ после трех часовой инкубации в $CO_2$ инкубаторе.

Осмотическое поведение клеток наблюдали под микроскопом Axsio Obzerver Z1 (Carl Zeiss, Германия) в растворах 1М, 2М, 3М и 4М NaCl, фотографируя микроскопические изображения и анализируя динамику изменения клеточных размеров при помощи программы AxioVision Rel. 4.8.

В качестве морфометрического параметра был выбран объем клеток, имеющих форму, близкую к сферической. Статистическую обработку экспериментальных результатов проводили стандартным методом, пользуясь пакетом программ Exel 2003 с использованием t - критерия Стьюдента, при вероятности попадания в доверительный интервал 0,95 (Орлов А.И. 2006).

В связи с тем, что NaCl рассматривается как в норме не проникающий в клетки компонент раствора, следует ожидать, что в гипертонических растворах обезвоженное состояние клеток будет сохраняться вплоть до нарушения барьерной функции клеточных мембран. Как показывают наши данные, за время єксперимента в 0,5М растворах NaCl нарушения барьерной функции мембран клеток СПЭВ не происходит. В 1М растворах соль проникает в клетки после пяти, в 2М – после трех минутной экспозиции, а в 3 и 4М - уже в процессе дегидратации (рис. 1). Полученные нами зависимости времени образования дефектов в мембранах клеток СПЭВ от концентрации гипертонического раствора согласуются с ранее опубликованными данными, полученными на гепатоцитах крысы (Кулешова Л.Г. 2002). О поступлении в клетки NaCl может свидетельствовать наблюдаемое нами в экспериментах увеличение объема дегидратированных клеток (рис. 1). Более конкретные выводы позволяет сделать физико-математическое моделирование процессов трансмембранного переноса соли через возникающие мембранные дефекты. Физико-математическая модель, применяемая нами для анализа полученных экспериментальных данных, с момента образования дефекта в клеточной мембране может рассматривать NaCl как проникающий компонент раствора, а также позволяет оценить скорость его проникновения в клетку и время достижения внутриклеточной концентрацией уровня, близкого к уровню внеклеточной концентрации электролита (рис. 1 и 2, табл.).

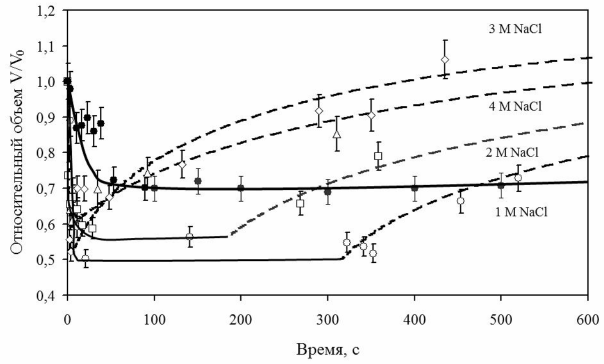



Рис. 1. Изменение относительного объема клеток СПЭВ со временем в гипертонических растворах NaCl

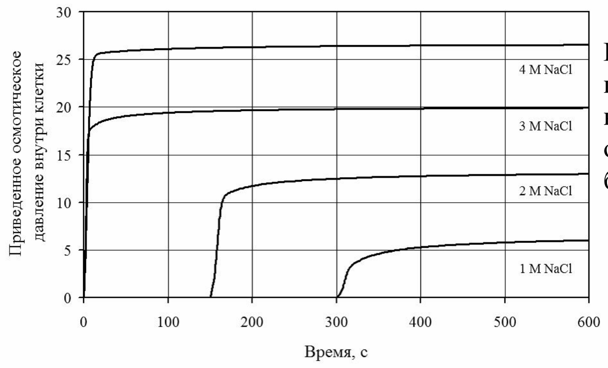



Рис. 2. Динамика проникновения NaCl в клетки СПЭВ после образования мембранных дефектов

Таблица.

Параметры проницаемости мембран клеток СПЭВ с нарушенной барьерной функцией

| Концентрация NaCl, Моль | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| Время достижения внутриклеточной концентрацией NaCl 90% уровня внеклеточной, с | 300 | 210 | 46 | 13 |
| Коэффициент проницаемости NaCl $K_1 x 10^8$, м/с | 1,38±0,4 2 | 3,33±0,28 | 10,5±1,9 | 11,7±2,3 |

Из приведенных данных следует, что после нарушения барьерной функции мембран клеток СПЭВ для NaCl проникновение соли в клетку происходит со скоростями, сопоставимыми со скоростями проникновения таких криопротекторов, как ДМСО (Чернобай Н.А., 2012), а увеличение концентрации NaCl от 1 до 4М приводит к увеличению коэффициента проницаемости для этой соли на порядок.

Чтобы определить, как коррелируют нарушения барьерной функции мембран клеток СПЭВ, оцененные по проницаемости NaCl и трипанового синего, мы изучали осмотическое поведение клеток в 4М растворах хлористого натрия, в которых был растворен трипановый синий. В процессе наблюдаемой осмотической реакции (~5мин), связанной с проникновением в клетки NaCl, трипановый синий, если судить по отсутствию окрашивания клеток, в них не проникает. Возникает вопрос - не связано ли это с размерами образующихся мембранных дефектов, через которые могут проникать в клетки ионы натрия, но не молекулы красителя.

В исследованиях процессов замораживания–оттаивания суспензий клеток почки сирийского хомяка методом криомикроскопии (Кулешова Л.Г., 1986) показано, что после медленного замораживания, которое сопровождается набуханием клеток (образованием мембранных пузырей) и грануляцией цитоплазмы, накопление клетками трипанового синего происходит при температуре выше 0°С за время порядка 2 мин. Это время сопоставимо с временем контакта красителя с клетками в нашем эксперименте. Вместе с тем следует заметить, что после медленного замораживания проникновение красителя происходит в набухающие (увеличивающие свой объем до значений, превышающих исходное значение) клетки. Но является ли набухание необходимым условием окрашивания клеток? На этот вопрос данные цитируемой нами работы (Кулешова Л.Г., 1986) дают отрицательный ответ. Быстро замороженные клетки почки сирийского хомяка, содержащие внутриклеточный лед, окрашиваются трипановым синим в процессе отогрева уже при 0°С, однако явных признаков набухания не проявляют. Таким образом, вопрос о соотношении размеров дефектов, приводящих к набуханию клеток в результате проникновения в них внеклеточного NaCl, и дефектов, приводящих к их окрашиванию суправитальным красителем, остается для нас неясным.

ВЫВОДЫ

Клетки СПЭВ, которые в гипертонических растворах NaCl сохраняют форму, близкую к сферической, являются удобным объектом для изучения кинетики осмотических реакций клеток, в том числе связанных с нарушением барьерной функции их плазматических мембран.

При увеличении концентрации NaCl время контакта клеток с гипертоническими растворами этого электролита до нарушения барьерной функции уменьшается, а скорость проникновения соли в клетку возрастает.

**Литература**

1.Гордиенко Е. А. Пушкарь Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / К.: Наукова думка.1994. 142 с.

2.Орлов А. И. Прикладная статистика / М.: Экзамен, 2006. 671 с.

3.Кулешова Л. Г., Гордиенко Е. А., Коваленко И. Ф. Проницаемость плазматических мембран гепатоцитов крысы для молекул воды в неизотонической среде электролита // Біофізичний вісник. 2002. Вип.2(11). С.39–42.

4.Чернобай Н. А. Температурная зависимость осмотических реакций клеток стероид продуцирующих тканей и СПЭВ в растворах криопротекторов: дис. … кандидата биол. наук: 03.00.19 /Х. 2012. 131 с.

5.Кулешова Л. Г., Худяков Г. А. Повреждение клеток почек сирийского хомячка при замораживании // К.: Наукова думка. Криобиология и криомедицина.1983. вип.12. С.24–28.

## ЗАВИСИМОСТЬ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОНИКАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ОТ ОБЪЕМОВ «СВОБОДНОЙ НЕЗАМЕРЗАЮЩЕЙ» ВОДЫ В СПЕРМИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РЫБ

**Красильникова А.А., Тихомиров А.М.**
ФГБУН Южный научный центр Российской академии наук,
Ростов-на-Дону, Россия
E-mail: alexandra.kras@yandex.ru; tixomirov41@mail.ru

Одной из основных задач криобиологии является поиск методов искусственной защиты клеток от повреждений при замораживании-оттаивании. Однако, в настоящее время недостаточно отработаны приемы предохранения клеток от токсического влияния криопротекторов проникающего действия на органеллы сперматозоидов в период эквилибрации. В настоящее время известно порядка ста различных веществ, обладающих криозащитным действием и апробированных на различных биологических объектах, однако наиболее детально изучены биологическое действие и криопротекторные свойства только нескольких десятков веществ, широко используемых в практике низкотемпературного консервирования

(Тихомиров А.М. и др., 2011). Криопротекторы, помимо защитного, оказывают также и токсическое действие на клетки, что является стрессовым фактором. Известно, что многие, наиболее часто используемые криопротекторы, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин (ГЛ), являются пертурбантами плазматических мембран и обладают способностью заменять гидратную воду, стабилизирующую конформацию белков, липидов и других биомолекул (Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994). Токсичность данных веществ рассматривается с точки зрения гипотезы денатурации белков (Arakawa T. et al., 1990), согласно которой криопротекторы связывают воду, препятствуя тем самым нормальной гидратации белков и других макромолекул (Кучков В.Н., Зинченко В.Д., 2010).

Известно, что «свободная незамерзающая» вода, (Невзоров А.Н., 2006), составляет от 15% до 25% протоплазмы. Основной состав последней – это биологические суспензии, которые при понижении температуры образуют монокристаллы. В свою очередь, кристаллы «свободной незамерзающей» воды, находясь в твердой фазе имеют особенность изменять форму и размеры при изменении отрицательных температур, что и является источником механических повреждений органелл клеток. По всей видимости именно эта «свободная незамерзающая» вода при глубокой заморозке и является источником механических повреждений органелл средней части спермия. Следовательно, стратегия защиты сперматозоидов разных видов рыб во время криоконсервации должна основываться на защите именно средней части клетки, как места нахождения «свободной незамерзающей» воды.

Объемы «свободной незамерзающей» воды в сперматозоидах рыб различных экологических групп, исследовали в семенной жидкости белуги, русского осетра, стерляди, речного окуня, сазана, чешуйчатого карпа, разбросанно чешуйчатого карпа, белого амура, белого и пестрого толстолобиков, белорыбицы, содержащихся на рыбоводных заводах и рыбопитомниках Астраханской области. После обработки спермиев ацетоном и многократных сеансов центрифугирования в течение 30 минут при скорости 8000 оборотов в минуту, отбирали отделившуюся воду и взвешивали пробирки с содержимым. Испытания проводили в трехкратной повторности. Выходным показателем являлся вес воды, выделившейся после центрифугирования с добавлением ацетона. Значимость различий между отельными операциями определяли по критерию Стьюдента.

Данные по количеству «свободной незамерзающей» воды в спермиях рыб представлены на рис. 1.

Наименьшее количество выделившейся воды отмечено у представителей семейства осетровых, причем у белуги эта величина меньше, чем у русского осетра и стерляди. Очевидно, это связано с тем, что в половых продуктах белуги очень много полостной жидкости, следовательно меньше концентрация спермиев на единицу объема. У представителей семейства карповых наибольшее количество выделившейся «свободной» воды. Белорыбица занимает промежуточное место между представителями семейств осетровых и карповых.

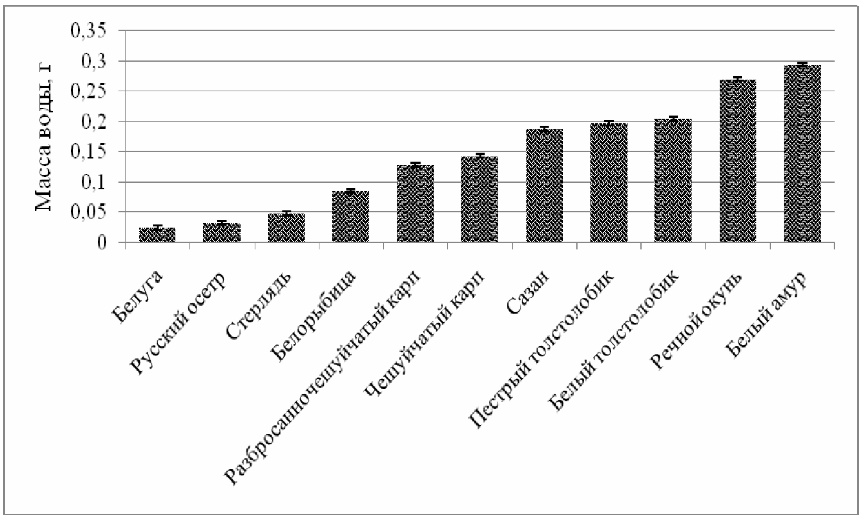



Рис.1. Количество воды, выделившееся из 1 мл спермы рыб после центрифугирования с добавлением ацетона

Все методики криоконсервации объединяет одна операция, которая является одним из наиболее важных этапов – соединение семенной жидкости с криозащитным раствором. Отечественные и зарубежные ученые предлагают разное соотношение данных величин. Обычно используется разведение 1:1, однако имеются публикации, где упоминается разведение 1:3 (Legendre M., Billard R., 1980), 1:5 (Harvey B., 1983) или даже 1:9 (Magyary I. et al., 1996). Однако этому нет научного обоснования. Очевидно, что излишнее количество криопротекторов, как токсикантов, негативно влияет на качество сперматозоидов после двойного температурного шока. Следовательно, уменьшение количества криозащитного раствора, необходимого для связывания «свободной незамерзающей» воды в половых клетках должно повысить их качество после криоконсервации.

Низкотемпературное консервирование мужских репродуктивных клеток осетровых рыб проводили согласно разработанной ранее методике (Богатырева М.М., 2010; Белая М.М., Тихомиров А.М., 2013). Однако, в криозащитном растворе, включающем базовый раствор, сахарозу, маннит, ДМСО и желток, на основании полученных данных о содержании «свободной незамерзающей» воды, было уменьшено содержание ДМСО (для сперматиозоидов белуги его количество составило 3%, для русского осетра – 4%). Результаты представлены на рис. 2.

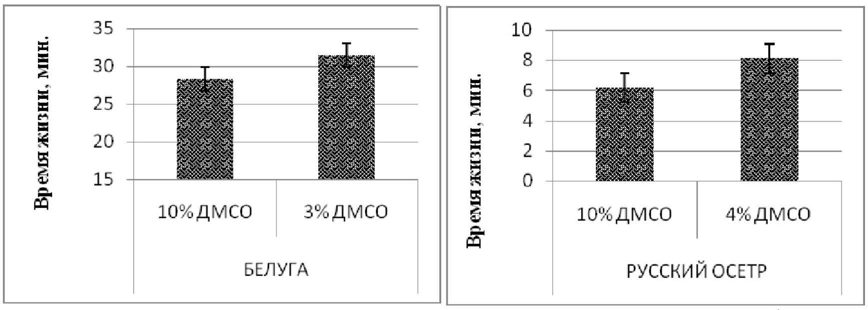



Рис. 2. Время жизни сперматозоидов осетровых видов рыб после дефростации

Снижение количества отравляющих веществ в составе криопротектора привело к повышению времени жизни дефростированных клеток. Полученные результаты позволяют рекомендовать корректировку концентрации проникающих протекторов в криозащитном растворе в зависимости от объема «свободной незамерзающей» воды.

**Литература**

1. Белая М.М., Тихомиров А.М. Научно-методические рекомендации по сохранению биологического разнообразия южных морей РФ с применением современных методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013.14 с.

2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев: Наук. думка, 1994. 430 с.

3. Богатырева М.М. Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб // Автореф. дис. … канд. биол. наук. Астрахань, 2010. 20 с.

4. Кучков В.Н., Зинченко В.Д. Активность воды как показатель связывания криопротектора с эритроцитами // Доповіді Національної академії наук України, 2010, №10. С. 184-189.

5. Невзоров А.Н. О внутреннем механизме кристаллизации метастабильной жидкой воды и об его эффектах, влияющих на внутриоблачные процессы // Изв. АН РАН Физ. Атм. и Океана. 2006. Т. 42. № 6. С. 830–838.

6. Тихомиров А.М., Богатырева М.М., Красильникова А.А. Разработка криозащитных сред для низкотемпературного консервирования сперматозоидов белорыбицы (Stenodus leucichthys Gьldenstдdti, 1772) в целях сохранения генофонда // Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство. 1/2011. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2011. С. 58 – 62.

7. Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y.A., Crowe J.H. Basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology. 1990. 27, Issue 4. P. 401–415.

8. Harvey B. Aquaculture 1983. 32, P. 313-320.

9. Legendre M., Billard R. Reprod. Nutr. Develop.1980.20. P. 1859-1868.

10. Magyary I., Urbanyi B., Horvath L. J. Appl. Ichthyol. 1996. 12. P. 113-115.

## АКТИНОВЫЙ ЦИТОСКЕЛЕТ НАТИВНЫХ И ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ООЦИТОВ СВИНЕЙ

**Кузьмина Т.И.[1], Багиров В.А.[2], Мутиева Х.М.[1]**

*[1]Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных ФАНО, Санкт-Петербург -Пушкин, Россия*

*[2]Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства, ФАНО,* Подольский район, Дубровицы, Московская область, *Россия*

E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Ооциты млекопитающих чрезвычайно чувствительны к гипотермии, и успехи в замораживании женских гамет не столь убедительны, как в криоконсервации мужских гамет и эмбрионов. Все это обуславливает нестабильность результатов экспериментов по получению эмбрионов из девитрифицированных (ДВ) ооцитов и вызывает необходимость фундаментальных исследований механизмов криорезистентности женских гамет. До настоящего времени число потомков, полученных из ДВ ооцитов животных разных видов, незначительно [L. J. Maclellan et al., 2002; E.J.Woods et al., 2004]. Исключение представляют феноменальные достижения доктора Kuwayama в получении потомства у человека из ДВ ооцитов [M. Kuwayama, 2010]. Причины таких высоких результатов кроются в ряде методических приемов и специфики технологии созревания и оплодотворения ооцитов in vitro у человека. Во-первых, ооцит для витрификации извлекают из живого организма женщины, предварительно подвергшейся гормональной обработке, витрификация осуществляется в минимизированном объеме криопротектора (в криотопах), а оплодотворение, в основном, проводится методом интрацитоплазматической инъекции спермотозоида. Витрификация - относительно простой и недорогой метод, однако, несмотря на более 20 лет интенсивных исследований в этой области до сих отсутствуют стандартные протоколы витрификации, информативные тесты прогнозирования качества ооцитов.

Витрификация женских гамет – эффективный инструмент для решения важнейших проблем репродуктивной медицины, внедрения достижений клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства, сохранения генофонда исчезающих пород [Vajta G, et al.2006; Cobo A., et al.2008]. Возможность криоконсервации ооцитов и создание криобанков женских гамет значительно расширит возможности эмбриотехнологий. Структура актинового цитоскелета влияет на важнейшие клеточные процессы, такие как дифференцировка, цитокинез, обеспечение транспорта РНК, белков и цитоплазматических органелл. Созревание ооцитов млекопитающих сопровождается значительными изменениями в структуре цитоплазматических компонентов, в частности, благодаря реорганизации цитоскелета. Все три компонента цитоскелета, в том числе фибриллы актина, обеспечивают передвижение как хромосом, так и различных органелл, способствуя формированию кортекса, полярности ооцита, ориентации веретена деления и правильному прохождению первого и второго мейотических делений, актин участвует во внутриядерном транспорте и в сборке ядерной оболочки [Reynaud, 2001; Azoury et al., 2009]. Исследование механизмов функционирования структурных компонентов цитоскелета витрифицированных ооцитов - актуальная проблема криобиологии.

Материалом для исследований служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) из антральных фолликулов свиней (породы ландрас), убитых на мясокомбинате Санкт-Петербурга. Ооциты, предназначенные для витрификации, обрабатывались тремя растворами криопротекторов (CPA), приготовленными на среде TC-199 с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, Logan, UT). CPA-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); CPA-2: 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; CPA-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалоза. Ооциты поэтапно экспонировали в течение 30 сек в CPA-1, затем в CPA-2 и затем в CPA-3 20 секунд. Пайеты с ооцитами помещали в жидкий азот. Витрифицированные ооциты находились в жидком азоте не менее 1 часа. Ооциты извлекали из пайет и помещали в 0,25 М трегалозу в ТС-199 с 10% ФБС при 37$^0$С, отмывали последовательно в 0,19 М и затем в 0,125М трегалозе, и в конце только ТС-199. Визуализацию актинового цитоскелета в ооцитах и эмбрионах осуществляли окрашиванием флуоресцентным красителем родамин-фаллоидином (R415, Invitrogen), конъюгированным с родамином, позволяющим выявлять полимеризованный актин (F-актин), клетки экспонировали 30 минут, затем помещали в раствор, препятствующий выцветанию препарата (DABCO), содержащего 1 μg/ml 4‘,6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на базе инвертированного микроскопа Leica TCS SP5 получали серии оптических срезов (x, y, z). 3D-реконструкция полученных серий конфокальных изображений и построение максимальных проекций было проведено с помощью программного обеспечения LAS AF (Leica). Для возбуждения флуоресценции использовали  лазер с длиной волны 543 нм для родамин-фаллоидина. Анализ проводили на базе Центра коллективного пользования «Хромас» (Санкт-Петербургский Государственный Университет).

Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов бриллиантового кристаллического голубого красителя (BCB) – индикатора активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PDH) обеспечивает возможность использования женских гамет  для дальнейшего культивирования, их оплодотворения и получения эмбрионов [Alm et al., 2005]. Этот способ оценки завершенности фазы роста получил название ВСВ-диагностики или ВСВ-теста. Фермент активен в растущих ооцитах, однако, в клетках, завершивших стадию роста, снижает свою активность. ВСВ тест основан на способности G6PDH конвертировать ВСВ из голубой окраски в бесцветную в растущих ооцитах. В цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах ВСВ не теряет свой цвет. Для проведения ВСВ - теста ОКК   отмывали в растворе Дюльбекко с добавлением 0,4 % бычьего сывороточного альбумина (А-7888; mDPBS), затем в течение 60 минут подвергали воздействию раствора 13μМ ВСВ (В-5388). Далее ОКК отмывали в растворе Дюльбекко дважды, после чего ооциты оценивали под бинокулярной лупой и разделяли на две группы: ооциты с голубой окраской цитоплазмы ВСВ(+) – завершившие фазу роста и ооциты с неокрашенной цитоплазмой  ВСВ(-) - растущие.

Ранее нами обнаружено, что уровень интенсивности флуоресценции родамин-фаллоидина (ИФРФ) в ооцитах коров, не завершивших фазу роста in vivo, превышал таковой в ооцитах, завершивших фазу роста. [Кузьмина Т.И., Скотти О.С., 2012]. Вышеизложенное можно интерпретировать с учетом полученных нами данных о незавершенности роста ВСВ(-) ооцитов, в которых проходят синтетические процессы, затрагивающие реорганизацию и формирование клеточных компартментов [Kuzmina T.I. et al., 2011; Кузьмина и др., 2010]. Также было обнаружено, что предварительная экспозиция ооцитов коров в жидкости фолликулов диаметром d”3 мм увеличивает выход созревших ооцитов и полученных из них эмбрионов [Kuzmina T.I. et al., 2010].

В следующей серии экспериментов мы определяли уровни ИФРФ в нативных и ДВ ооцитах свиней, предварительно оцененных на основе ВСВ теста. Результаты по оценке ИФРФ в нативных и ДВ ооцитах свиней, завершивших фазу роста, представлены в табл. В опытных группах нативные и ДВ ооциты предварительно подвергали воздействию инактивированной жидкости из фолликулов свиней (диаметр фолликула ≤3мм). В ДВ ооцитах свиней на стадии диплотены ИФРФ была значительно ниже, чем в нативных (19,1±0,97 усл.ед против, 42,6±2,1 усл.ед, P<0.01), превентивная инкубация ооцитов в фолликулярной жидкости способствовала повышению ИФРФ (19,1±0,97 усл.ед против 29,9±1,67 усл.ед P<0.05).

Таблица.

Интенсивность свечения F-актина в нативных и девитрифицированных ооцитах свиней на стадии диплотены (5 часов культивирования, число ооцитов – 157)

| Группы эксперимента | Преинкубация ооцитов в фолликулярной жидкости (диаметр фолликула <3 мм) | Число ооцитов | Интенсивность свечения F-актина (усл.ед) |
|---|---|---|---|
| Нативные ооциты | - | 41 | 42,6±2,1[a] |
| | + | 39 | 33,2±2,2[b] |
| Девитрифицированные ооциты | - | 38 | 19,1±0,97[c] |
| | + | 39 | 29,9±1,67[d] |

Достоверность различия сравниваемых значений (t-критерий Стьюдента):[a:c]P<0.01, [a:b;a:d; b:c; c:d]P<0.05

Среда созревания ооцитов: NCSU 23 – синтетическая питательная среда+ 10 М.Е. хорионического гонадотропина человека + 10 М.Е. хорионического гонадотропина лошади + 10% фолликулярная жидкость (диаметр фолликулов 3-5 мм) + стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3-5 мм).

Выход эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты, полученных в результате оплодотворения девитрифицированных ВСВ(+) ооцитов, достигал 7% (12 эмбрионов из 173 ооцитов), что соответствует результатам, полученными другими исследователями [Prentice-Biensch et al., 2012; Zhang W, et al., 2012]. ИФРФ в ооцитах может быть использована в качестве маркера при разработке и совершенствовании методов витрификации женских гамет.

**Литература**

1. Alm H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Theriogen. 63 : 2194-2205. 2005.

2. Azoury J, Verlhac MH. Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell, 2009; 101(2):69-76.*

3. Cobo A. et al. Vitrification, an effective new approach to oocyte banking in healthy women, could be applied in cancer patients to preserve their fertility. Clinical and Translational Oncology; 2008,10:268-73.

4. Kuwayama M. Vitrification of human oocyte // Reproductive BioMedcine, 2010,v.20, suppl.3, p.538-539

5. Kuzmina T.I et al. Effect of somatotropin on development competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining //27th Annual Meeting A.E.T.E. – Chester, England, 9th – 10th September 2011, p.178

6. Kuzmina T.I. et al. Effect of pre-treating bovine oocytes with the follicular fluid prior to vitrification on their nuclear-cytoplasmic maturation/ // Reproductive BioMedcine, v.20, suppl.3, 2010, p.538-539

7. Maclellan L. J., E. M. Carnevale, et al. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from superstimulated and non-stimulated mares, Theriogenology, 2002,vol.58, no. 5, pp. 911–919

8. Prentice-Biensch et al. Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development.Reproductive Biology and Endocrinology 2012, 10:73

9. Reynaud K. et al. Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. Folia Histochem Cytobiol. 2001; 39(2):75-85.

10. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology 65 (2006) Pp. 236-244.

11. Woods E.J., J.D.Benson, Y.Agca et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues, Cryobiology, 2004.vol. 48, no. 2, pp. 146–156.

12. Zhang W.et al., Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. Anim Reprod Sci. 2012;132 (3-4):115-22.

13. Кузьмина Т.И., Скотти О.С. Актиновый скелет в растущих и завершивших фазу роста ооцитах коров. Цитология,2012,54 (1)

14. Кузьмина Т.И., Торнер Х., Альм Х. Инновационные эмбриотехнологии в репродукции животных: от фундаментальных исследований к практике. Достижения науки и техники АПК, № 4, 2010г, с 66-68.

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОБЪЕМНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ ТЕНЗОДИЛАТОМЕТРИЯ В ИЗУЧЕНИИ КИНЕТИКИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ-ПЛАВЛЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ РАСТВОРОВ**

**Осецкий А.И., Севастьянов С.С.**

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

Изучение процессов кристаллизации и плавления криопротекторных растворов составляет достаточно важный раздел в современной криобиологии, так как с ними связывают основные механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов. Однако общие закономерности этих процессов, так же, как и принципы построения диаграмм состояния, не ясны до сих пор. Это связано со сложным характером взаимодействия молекул воды A с молекулами криопротекторного вещества B. Существующие водородные связи лежат в широком энергетическом диапазоне 1…10 ккал/моль и могут существенно отличаться по величине для различных молекул воды даже в пределах одного ассоциата$A_nB_m$, где n и m – количество молекул воды и криопротекторного вещества в ассоциате соответственно. В результате слабо связанные молекулы воды способны покидать ассоциаты и участвовать в образовании отдельных кристаллов льда $A_s$. Сильно связанные ассоциаты не диссоциируют и при достижении температуры стеклования $T_g$ переходят в твёрдое состояние в виде аморфной фракции G [1]. Кроме того, в целом ряде криопротекторных растворов с таким характером межмолекулярных связей наблюдается образование некоторой гидратной фазы $\beta_c$ [2,3], или, при высоких концентрациях криопротекторного вещества, образование отдельных кристаллов $\beta_s$. Очевидно, что образование фаз $A_s$, $\beta_c$, $\beta_s$ сопровождается выделением тепла, а их плавление – поглощением. Поэтому в целом ряде случаев по тепловым пикам, отражающим эти процессы на термограммах, получаемых с помощью дифференциального термического анализа или сканирующей калориметрии, очень сложно определить тип наблюдаемого фазового перехода.

В связи с этим в настоящей работе апробирован специально созданный для этих исследований метод дифференциальной объёмной сканирующей тензодилатометрии [4]. Преимущество этого метода в данном случае состоит в том, что кристаллизация всех используемых в настоящее время криопротекторных веществ сопровождается уменьшением объёма системы, а образование кристаллов льда – его увеличением. В результате появляется возможность классифицировать фазовые переходы, сопровождающие кристаллизацию или плавление криопротекторных растворов. Более того, данный метод позволил впервые провести анализ структуры частиц гидратной фазы $\beta_c$. Согласно тензодилатограммам, полученным при изучении водных растворов глицерина, ДМСО, ПЭО-1500, этиленгликоля различных концентраций, эти частицы состоят из ядер в виде нанокристаллов льда $a_s$, окружённых оболочками из молекул криопротекторного вещества b в аморфном $b_g$ или $b_s$ кристаллическом состояниях.

Проведённые исследования позволяют расширить наши представления о криозащитных свойствах наиболее используемых в практической криобиологии растворах и, главное, получать данные для построения их полных диаграмм состояния.

**Литература**


1. Boutron P., Kaufman A. // Cryobiology. 1979. Vol.16. p. 557-568.
2. Osetsky A.I. // Cryoletters. 2011. Vol.32. p. 216-224
3. Malsam J., Aksan A. // J. Phys. Chem. B. 2009.Vol.113. p.6792-6799
4. Осецкий А.И., Давыдова Е.В. // Микрообъёмный дилатометр. Патент Украины №76143 от 25.12.2012


## ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОСЬМИ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СРЕЗЫ ГИППОКАМПА КРЫС


**Пичугин Ю.И.**

*НТЦ Криобиологии и анабиоза, Москва, Россия*

E-mail: scidep@ntckba.ru


Было изучено сравнительное токсическое действие восьми криопротекторов на срезы гиппокампа крыс. Сравнение токсического действия осуществлялось в одинаковых условиях для всех испытанных веществ.

Сравнивались 60% (в/об) растворы криопротекторов при действии на срезы в течение 15 минут при -10°С. Выживаемость срезов определялась методом отношения концентрации ионов калия к концентрации ионов натрия как для обработанных, так и для необработанных, контрольных срезов. Изученные криопротекторы расположили в ряд по уменьшению процента выживаемости и соответственно по увеличению токсического действия на срезы гиппокампа крыс: этиленгликоль (66,3%), глицерин (60,0%), 1,2 пропандиол (31,5%), диметилформамид (25,9%), диметилсульфоксид (17,9%), диметилацетамид (8,2%), 2-метоксиэтанол (6,3%) и формамид (2,1%).

Данное исследование является частью научного проекта, целью которого был исчерпывающий поиск наилучших витрифицирующих смесей для криосохранения как мозговой ткани, так и целого мозга животных. Первым этапом работы было изучение токсических эффектов наиболее используемых проникающих, эндоцеллюлярных криопротекторов (Пичугин Ю.И., 1993) на срезах мозговой ткани крыс. Общеизвестно, что ведущим фактором в успешной витрификации органов и тканей является преодоление токсичности витрификационных смесей. В научной литературе не было найдено работ, посвященных изучению токсических эффектов криопротекторов на мозговую ткань животных, кроме одной (Pichugin Y., 2006), в которой сообщалось, что 30% (в/об) глицерин практически не токсичен для срезов гиппокампа крыс. Целью данной работы была количественная оценка токсических эффектов восьми, наиболее используемых эндоцеллюлярных криопротекторов: этиленгликоля, глицерина, 1,2 пропандиола, диметилформамида, диметилсульфоксида, диметилацетамида, 2-метоксиэтанола и формамида.

Большинство методик экспериментов были подробно описаны ранее (Pichugin Y., 2006). В работе использовались самцы крыс породы Вистар весом 200-300 грамм. Крысы анестезировались изофлураном в закрытой камере, затем умертвлялись избытком этого анестетика. Мозг крыс быстро извлекался и помещался в инкубационный раствор при 2-4°С. Правая и левая половинки гиппокампа выделялись из мозга под холодным инкубационным раствором. Каждая половинка гиппокампа была порезана на 7-9 поперечных срезов толщиной 0,475 мм с помощью устройства МакИлвейна для резки биологических тканей. Срезы помещались и инкубировались в течение 1 часа в инкубационной Осло-камере при температуре +33°С. Инкубационный раствор состоял из следующие компонентов: 124 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 22 мМ $NaHCO_3$, 1.25 мМ $NaH_2PO_4$, 1.25 мМ $MgSO_4$, 2 мМ $CaCl_2$, и 10 мМ глюкозы. pH раствора устанавливалась и поддерживалась 7.4 с помощью карбогена (95% $O_2$/5% $CO_2$). После инкубационного восстановления 6-8 срезов брались на экспозицию с определенным криопротектором, а другие 6-8 срезов служили контролем, как необработанные срезы. Методика определения выживаемости срезов гиппокампа крыс по K+ /Na+ тесту подробно описана в работе (Pichugin Y., 2006). Транспортным раствором для криопротекторов служил RPS-2 раствор (Fahy G.M., 1995).

Протокол экспозиции криопротекторов со срезами гиппокампа крыс был один и тот же для каждого криозащитного вещества:

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % криопротектора | 4 | 8 | 15 | 30 | 60 | 30+ | 15+ | 8+ | 4+ | + |
| Время экспозиции, мин. | 5 | 10 | 20 | 30 | 45 | 55 | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Время стадии, мин. | 5 | 5 | 10 | 10 | 15 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 |
| Температура стадии, $^{o}$C | 10 | 10 | 10 | 0 | -10 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 |

где: % есть процентная (в/об) концентрация; + - означает добавление маннитола в концентрации 0,3 моля на литр; мин. – минуты; °С – температура в градусах Цельсия.

Важно постепенное введение криопротектора в мозговые срезы и такое же постепенное удаление его из ткани. Это позволяет избегать осмотических стрессов, как и добавление изотонического количества маннитола при отмывании срезов от криозащитных веществ. После 80-минутной экспозиции с криопротектором срезы гиппокампа снова помещались в инкубационную камеру для восстановления. Срезы брались для определения выживаемости K+ /Na+ тестом после 60-минутной восстановительной инкубации. Были изучены именно сравнительные токсические эффекты криопротекторов на срезы гиппокампа, то есть не было попыток оптимизировать условия экспозиции для каждого индивидуального вещества для увеличения выживаемости. Результаты исследования приведены в таблице.

Таблица.

Выживаемость срезов гиппокампа крыс после экспозиции с криопротекторами

| Криопротектор | % выживаемости |
|---|---|
| Этиленгликоль | 66.3±10.4 |
| Глицерин | 60.0±5.8 |
| 1,2-пропандиол | 31.5±4.8 |
| Диметилформамид | 25.9±4.0 |
| Диметилсульфоксид | 17.9±2.6 |
| Диметилацетамид | 8.2±1.6 |
| 2-метоксиэтанол | 6.3±1.8 |
| Формамид | 2.1±0.5 |

Криопротекторы были использованы в одних и тех же экспериментальных условиях: конечные концентрации 60% (в/об), время экспозиции 15 минут при температуре -10°C ($n=5$, $p = 0.05$).

Наименее токсичными для срезов гиппокампа крыс были этиленгликоль и глицерин, поэтому они могут быть использованы как основные компоненты витрификационных смесей с пониженной токсичностью. Однако следует принимать во внимание и витрификационную способность криопротекторов. В этом отношении глицерин намного проигрывает этиленгликолю и диметилсульфоксиду. Диметилсульфоксид, несмотря на его повышенную токсичность, часто используется в витрификационных смесях благодаря его высокой витрифицирующей способности (Fahy G.M., 2004). Диметилацетамид и формамид обладают высокой токсичностью, поэтому их не следует использовать в витрификационных смесях (Fahy G.M., 2002).

**Литература**

1. Пичугин Ю.И. Итоги и перспективы поиска новых эндоцеллюлярных криопротекторов Проблемы криобиологии 2: 3-10, 1993.

2. Fahy G.M., Mouta C., Tsonev L. Cellular injury associated with organ cryopreservation: chemical toxicity and cooling injury in: Cell Biology of Trauma, (J.J. Lemasters, C. Oliver, Eds.), RC Press, Boca Raton, 1995.

3. Fahy G.M., Wowk B. Cryoprotectant solution containing dimethyl sulfoxide, an amide and ethylene glycol, United States Patent 6,395,467 B1 (2002).

4. Fahy G.M., Wowk B., Wu J. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances, Cryobiology 48: 157–178, 2004.

5. Pichugin Y, Fahy GM, Morin R. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification Cryobiology 52: 228-240, 2006.

**Abstract**

Comparative toxic effects of eight cryoprotective agents on rat hippocampal slices were studied. Comparison of the toxic effects was performed in the same experimental conditions for all of cryoprotectants. 60% (w/v) solutions of cryoprotectants were tested on the rat hippocampal slices for 15 minutes at -10pC. Survival of the slices was tested by a method of ratio of potassium ion concentrations to sodium ion concentrations for both the treated slices and the untreated, control ones. Studied cryoprotectants were arranged in order of decreasing percentage of slice survival and accordingly in order of increasing the toxic effects: ethylene glycol (66,3%), glycerol (60,0%), 1,2 propanediol (31,5%), dimethylformamide (25,9%), dimethyl sulfoxide (17,9%), dimethylacetamide (8,2%), 2-methoxyethanol (6,3%) and formamide (2,1%).

# КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ОПТИМАЛЬНОЙ СКОРОСТИ ОХЛАЖДЕНИЯ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

**Стриха О.А., Артуянц А.Ю., Гордиенко О.И., Гордиенко Е.А.**

*ИПКиКИнститут проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина*

E-mail: oksana.strikha@mail.ru

Одной из актуальных задач современной науки является разработка способов длительного консервирования биологических объектов путем их глубокого замораживания. На сохранность криоконсервируемых клеток влияет большое количество факторов, действию которых они подвергаются в процессе замораживания и последующего плавления (Гордиенко Е.А. с соавт., 2012). С целью сокращения затрат, экономии времени и повышения эффективности научных исследований на этапе разработки способов криоконсервирования биообъектов целесообразно использовать метод численного моделирования процессов и явлений, которые происходят при их замораживании и последующем оттаивании. Большинство факторов, вызывающих повреждение клеток при низкотемпературном консервировании, непосредственно или косвенно связаны с образованием в клеточной суспензии кристаллов льда. Численное моделирование процессов, протекающих в течение цикла «замораживание-оттаивание» клеточных суспензий, позволяет на основании расчетов прогнозировать, какие протоколы криоконсервирования являются более эффективными, чем другие, и тем самым заменить часть реальных экспериментов теоретическими расчетами (Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С., 1994).

Нами разработан универсальный алгоритм, который позволяет путем компьютерного моделирования определить оптимальные условия криоконсервирования клеточной суспензии на основе небольшого количества данных о геометрических и транспортных параметрах клеток и о физико-химических характеристиках внеклеточной криозащитной среды.

Оптимальным с точки зрения предотвращения повреждения клеток внутриклеточными кристаллами льда является режим охлаждения $T(\tau)$, при котором вероятность внутриклеточной кристаллизации $W^*$ минимальна по сравнению с другими режимами охлаждения. 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.

$$W^{*} = -\frac{T_0}{A\beta}\int_{1}^{\frac{T_e}{T_0}}(C^{*} - C_{in})^2 exp\left[-\frac{B}{T^{*3}(C^{*}-C_{in})^2}\right]dT^{*} \quad (1)$$

где $T_0$ – температура, при которой начинается кристаллизация внеклеточного криозащитного раствора диметилсульфоксида, $T_e$– эвтектическая температура, $C^*$ – концентрация криопротектора в жидкой фазе кристаллизующейся суспензии, $C_{in}$ – концентрация внутриклеточного раствора, $T^* = T/T_0$, Т – абсолютная температура. Константы A и D выражены в единицах времени, а скорость охлаждения β – в К/мин.

Кроме того, поскольку в замораживаемой клеточной суспензии, как правило, очень велико количество клеток, можно рассматривать их совокупность как статистический ансамбль и отождествить вероятность $W^*$с долей 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 повреждения клеток усиливается с увеличением концентрации раствора, контактирующего с клеточными структурами, и временем экспозиции клеток в нем. Одной из самых простых зависимостей для вероятности криоповреждения клеток на этапе кристаллизации эффектами раствора, учитывающей две указанных характерные особенности действия этого фактора на криоконсервируемые биологические объекты, является следующая зависимость этой вероятности от концентрации внутри– и внеклеточного гипертонических растворов $C_{in}$ и $\tilde{C}$ а также от длительности контакта с ними:

$$W^{**} = -\frac{T_0}{2D\beta}\int_{1}^{\frac{T_e}{T_0}}(C_{in}C^{*})dT^{*} \quad (2)$$

Определенная, таким образом, вероятность повреждения клеток эффектами раствора, очевидно, растет с увеличением длительности их действия. Выбор подынтегрального выражения в виде произведения концентраций внутри и внеклеточного растворов учитывает то обстоятельство, что повреждения структурных и функциональных элементов клетки может происходить как в результате непосредственного контакта внешней поверхности мембраны клетки с окружающим ее внеклеточным раствором, так и в результате повреждения субклеточных структур окружающим их внутриклеточным гипертоническим раствором. Численное моделирование процессов, протекающих в течение цикла «замораживание-оттаивание» клеточных суспензий, позволяет на основании расчетов прогнозировать, какие протоколы криоконсервирования являются более эффективными, чем другие, и тем самым заменить часть реальных экспериментов теоретическими расчетами.

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: $W = W^{*} + W^{**}$. При заданной постоянной скорости охлаждения, оптимальная скорость охлаждения соответствует минимуму функционала W:

$$W^{*} + W^{**} = \min \tag{3}$$

Величина W·100% очевидно определяет процент поврежденных в процессе кристаллизации суспензии клеток.

На основании полученного выражения было получено значение оптимальной скорости охлаждения для суспензии дрожжевых клеток *C.albicans* в растворе «диметилсульфоксид (5 объемных %) – 0,135M NaCl – вода». Зная биофизические и геометрические параметры замораживаемых клеток и диаграмму плавления криозащитного раствора, по уравнениям Лагранжа, соответствующим вариационному принципу (3) при помощи стандартных компьютерных программ несложно рассчитать, как изменяется концентрация и пресыщение внутриклеточного раствора, а также процент клеток, который повреждается при снижении температуры в процессе замораживания. На рис. 1 в качестве примера приведены расчетные данные о зависимости количества поврежденных при замораживании суспензии микроорганизмов *C. albicans* в 5%-ном водном растворе диметилсульфоксида от скорости охлаждения. Как следует из результатов расчета, в диапазоне скоростей охлаждения ⩽3°C/мин. криоповреждение клеток происходит только за счет эффектов раствора и определяется интегралом (2), а при скоростях охлаждения ⩾6°C/мин – преимущественно в результате внутриклеточной кристаллизации. Зависимость суммарного вклада этих факторов в криоповреждение клеток имеет сравнительно широкий минимум в диапазоне скоростей охлаждения 4°C/мин…8°C/мин (рис. 1) (Марущенко В.В. с соавт., 2009).

Таким образом, оптимальной скоростью охлаждения на этапе кристаллизации при замораживании суспензии микроорганизмов *C. albicans* под защитой 5%-ного раствора диметилсульфоксида является скорость охлаждения около 4°C/мин. Эта теоретическая оценка согласуется сполученными нами экспериментальными данными (Сиренко А.Ю. с соавт., 2008), представленными на рис. 2.


Рис. 1. Расчетная зависимость количества поврежденных при замораживании суспензии микроорганизмов *C. albicans* в 5%-ном водном растворе диметилсульфоксида от скорости охлаждения.

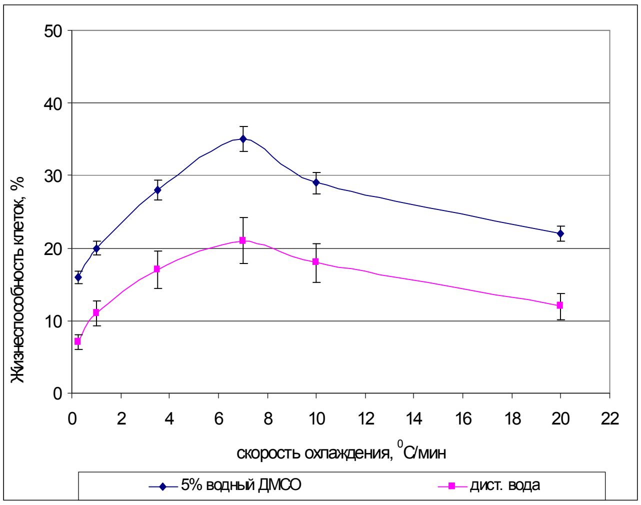



Рис. 2. Зависимость колониеобразующей способности *C. albicans* от скорости охлаждения суспензии этих клеток в 5%-ном водном растворе диметилсульфоксида.

**Литература**

1. Гордиенко Е.А. Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Механизмы защиты клеток от криоповреждения вне- и внутриклеточным льдом /Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков, 2012. С. 9-44.
2. Гордиенко Е. А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкарь. К.: Наукова думка. 1994. 142 с.
3. Марущенко В.В., Гордиенко Е.А. Зависимость вероятности внутриклеточного льдообразования от уровня пересыщения в дрожжеподобных грибах *Saccaromycescerevisiae* // Біофізичнийвісник. 2009. Вип. 22, №1. С. 65-70.
4. Сиренко А.Ю. (Артуянц А.Ю.), Марценюк В.Ф., Высеканцев И.П. Разработка эффективных условий криоконсервирования дрожжеподобных грибов рода *Candida* // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18, №3. С. 297-298.

## КРИТИЧЕСКАЯ ОПАЛЕСЦЕНЦИЯ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ – ОТОГРЕВЕ КЛЕТОЧНОГО СОКА ЧЕСНОКА

**Ходько А. Т., Лысак Ю.С.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: lutsenko_lena@mail.ru

Из криомикроскопических исследований процессов охлаждения клеточных суспензий и тканей известно явление кратковременного потемнения клеток (Розанов Л.Ф., 2004), так в частности, такое явление описано в протопластах лука (Самыгин Г.А.,1974).

Это явление в указанных работах объясняется появлением в ходе охлаждения мельчайших кристалликов льда, рассеивающих свет. Однако такое объяснение нельзя признать удовлетворительным, поскольку согласно закону Рэлея интенсивность рассеянного света прямопропорциональна квадрату объема рассеивающих частиц и, следовательно, с их ростом должна только усиливаться.

С другой стороны (Папков С.П., 1981) известно, что протоплазма клеток представляет собой в значительной мере систему полимер – растворитель. В таких системах могут происходить фазовые переходы типа жидкость – жидкость (ФПТЖ-Ж). Эти переходы могут протекать по двум механизмам: нуклеации – роста зародышей, по механизму спинодального распада и может иметь место сочетание обоих механизмов (Липатов Ю.С., 1984). Явление фазового распада сопровождаются комплексом критических явлений, когда появляется или исчезает новая фаза. Самым заметным и легко регистрируемым из них является критическая опалесценция (КО), проявляющаяся в резком увеличении светорассеяния по мере приближения к критическому состоянию из-за сильных флуктуаций концентрации и плотности в его окрестностях. Индикатриса (диаграмма направленности) светорассеяния в этом состоянии резко вытянута в сторону источника света, что приводит к его практически полному отражению и, следовательно, к затемнению объекта в проходящем свете (Физическая энциклопедия, 1994). Большинство исследований фазового разделения в высокомолекулярных системах базируется на разработанной П. Дебаем методике изучения КО (Debye P., 1959) . Критические явления имеют место только в случае равновесия изотропных фаз, следовательно, в случае ФПТЖ-Ж или жидкость – газ они имеются, а при фазовом перехода жидкость – кристалл они отсутствуют (Химическая энциклопедия, 1990). По наличию критического состояния можно судить о природе фазового перехода.

Именно это явление может объяснить явление потемнения клеток, не вступая в противоречие с законом Рэлея. Поскольку объем клетки мал, то длительность процесса также мала и для надежной регистрации КО необходимо исследовать какой-то модельный объект максимально близкий по составу, но имеющим большие размеры, и, следовательно, позволяющий более длительное время и в больших деталях изучать процессы происходящие при охлаждении - отогреве.

В качестве такой модели нами был избран клеточный сок чеснока, полученный из зубков и профильтрованный через капроновый фильтр.

Цель работы - определить наличие процесса КО в клеточном соке чеснока при охлаждении – отогреве.

Клеточный сок чеснока в объеме 25 мкл помещался на поверхность стеклянной чашки Петри, при этом ее диаметр составлял 10 – 12 мм, и охлаждался путем обдува холодными парами азота непосредственно под объективом микроскопа PZO Warshawa (Польша). Результаты фиксировались в видео режиме микроскопической камерой “LEVENHUK C 130” в проходящем свете при увеличении Ч80. Временные промежутки определялись по таймеру камеры. Число параллельных опытов – 5.

**Результаты и обсуждение.** При охлаждении исследуемого объекта наблюдалось появление дендритной структуры, формировавшейся в поле зрения в течении 2 с рис.1, после чего через 4 с на ее фоне наблюдалось появление быстрорастущих темных участков, имеющих различимую игольчатую структуры по краям рис. 2. За 8 с после их появления поле зрения полностью затемнялось, и процесс охлаждения прекращался. Отогрев производился на столике микроскопа, и просветление системы происходило через 75 с. Вслед за этим наблюдались выраженные процессы конвекции и через 40 с система принимала вид близкий к первоначальному, о котором можно судить по правой части рис. 1, в поле, где отсутствуют дендритные структуры.

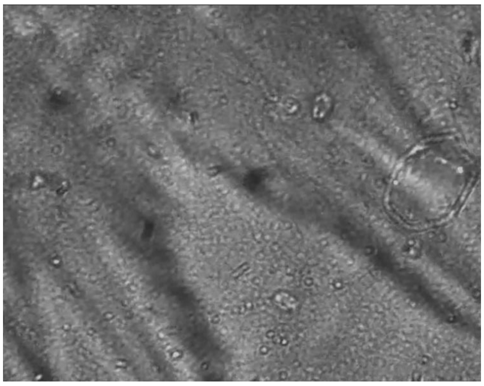


Рис. 1.Спинодальный распад в соке чеснока

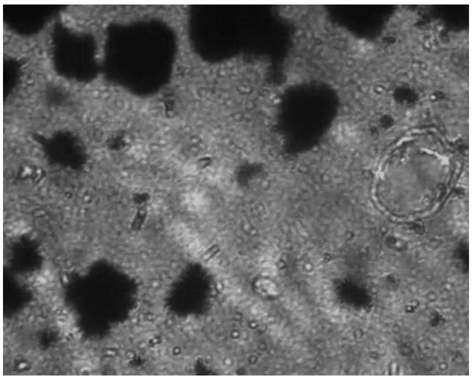


Рис.2.Критическая опалесценция в начальном этапе фазового распада по механизму нуклеации-роста зародышей. Состояние через 5 сек после состояния на рис.1.

В параллельных опытах были получены схожие результаты, но не во всех случаях наблюдалось появление фрактальных дендритных структур.

Описанная картина характерна для ФПТЖ-Ж в растворах высокомолекулярных веществ, сочетающий в себе на ранних стадиях спинодальный механизм и механизм нуклеации – роста зародышей на более поздних этапах фазового распада, с характерной для этого механизма КО (Липатов Ю.С., 1984). Растворы полимеров обладают пониженной энтропией по сравнению с низкомолекулярными веществами, и вследствие этого более склонны к фазовому разделению (Холомберг К., 2007).

В описываемых системах может иметь место и кристаллизация, но первым актом фазового превращения всегда будет ФПТЖ-Ж, поскольку в этом случае для образования зародыша требуется только соответствующая флуктуация по концентрации без трехмерной упорядоченности, необходимой для возникновения зародыша кристаллической фазы (Папков С.П., 1981). Согласно представлениям С.Я. Френкеля, В.А. Каргина, З.Я. Берестневой процесс кристаллизации является вторичным (Тагер А.А., 1993). Такой процесс может занимать очень длительное время в связи с малой подвижностью полимерных звеньев в макромолекуле. Для достижения состояния близкого к равновесному, иногда требуется время эксперимента в несколько месяцев.

Подобное время не может иметь места в реальных криобиологических системах, следовательно, аморфное стеклообразное состояние при криогенных температурах для них может являться конечным стационарным. Равновесное кристаллическое состояние за экспериментальное время здесь не достигается из-за кинетических затруднений.

Полученные данные указывают на наличие в системе процесса критической опалесценции, свидетельствующей о фазовом переходе типа жидкость – жидкость в процессе охлаждения – отогрева сока чеснока.

**Литература**

1. Липатов Ю.С., Шилов В.В. Спинодальный распад в полимерных системах // Успехи химии 53 (7) 1984 С. 1197-1221.

2. Папков С.П. Равновесие фаз в системе полимер-растворитель. М.: Химия, 1981. 272с.

3. Розанов Л.Ф., Высеканцев И.П., Петренко Т.Ф. и др. Чувствительность клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и грибов Candida albicans к процессам вне- и внутриклеточной кристаллизации // Пробл. криобиологии. 2004. №3. С. 18-25.

4. Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений. М.: Наука, 1974. 191 с.

5. Тагер А.А. Основы учения о растворах неэлектролитов: Учеб. пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 1993. 312с.

6. Физическая энциклопедия. Научное издательство “Большая российская энциклопедия”. М. 1994.

7. Химическая энциклопедия: в 5 т. М.: Советская энциклопедия. Т.2 1990. 671 с.

8. Холмберг К., Йёнссон Б., Кронберг Б., Линдман Б.; Поверхностно – активные вещества и полимеры в водных растворах Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 528с.

9. Debye P. Ibid., 1959, v. 31, p. 680

## СЕКЦИЯ II

## КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, МИКРООРГАНИЗМОВ, ГАМЕТ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ, НАУКЕ, ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ДРУГИХ ОТРАСЛЯХ НАРОДНОГО ХОЗЯЙСТВА

# ПОКАЗАТЕЛИ ГОМЕОСТАЗА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АСЕПТИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ КОЖИ ПОСЛЕ ТЕРАПИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ АЛЛОФИБРОБЛАСТАМИ

**Абрафикова Л.Г., Петренко Т.Ф., Пишко О.В., Артуянц А.Ю.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины*
*Украина, г. Харьков, ул. Переяславская 23*
E-mail: abrafikova@mail.ru

Раневой процесс – сложный комплекс биологических реакций организма, развивающийся в ответ на повреждение тканей. Лечение и уход за ранами остается одной из важных проблем современной медицины. Из огромного числа лекарственных средств можно выделить несколько групп по их действию на рану: антимикробное, противовоспалительное, стимулирующее и высушивающее (Бодун Р.Д, 2008; Родовилов Б.Б. 2006; Сыгеников И.А., 1979). Выбор лекарственных средств и метод лечения ран напрямую зависит от фаз течения заболевания. В настоящее время исследователи уделяют большое внимание возможности стимулирования и нормализации репаративных процессов в раневой поверхности с помощью криоконсервированных фибробластов. Это обусловлено способностью этих клеток продуцировать компоненты внеклеточного матрикса, которые участвуют в репаративных процессах. Воспалительная реакция является основным механизмом, посредством которого организм восстанавливает повреждение ткани. Эта реакция является также первичным, контролируемым иммунной системой процессом, которым организм защищает себя от инфекционных агентов и токсических веществ (С.И. Шевченко, 2000). Эти процессы сопровождаются сдвигами синтеза печеночных белков, сопутствующих воспалению. В связи с этим, помимо изучения процессов заживления непосредственно в раневых дефектах, нами была изучена динамика изменений показателей острой фазы воспаления – церулоплазмина, гликопротеидов, серомукоидов, что позволило судить об эффективности метода клеточной терапии.

Эксперименты были проведены на самцах беспородных белых крыс 4-х месячного возраста. Экспериментальный раздел работы с животными выполнен на базе вивария ИПКиК НАН Украины. Эксперименты с животными проводили согласно „Загальних принципів експериментів на тваринах", одобренных III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 20.09.2004г.), а также в соответствии с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Strasburg, 1986). Асептическое воспаление кожи у экспериментальных животных моделировали путём подкожного введения 0,5мл 9% раствора уксусной кислоты (Семенів Д.В., 2006). Исследования острофазовых белков воспаления в сыворотке крови экспериментальных животных проводили на базе клинической лаборатории ХГДБ №16 г.Харькова. Определяли содержание церулоплазмина, гликопротеидов и серомукоидов. В исследованиях использовали унифицированые методы лабораторной диагностики, приборы и стандартные наборы реактивов фирмы «Филист-Диагностика», контрольные сыворотки фирмы «Филист-Диагностика», Днепропетровск. Для получения сыворотки крови экспериментальных животных кровь собирали в сухую пробирку, помещали в термостат при температуре 37°С, по истечению 30 мин центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин. и отбирали сыворотку (Западнюк И.П., 1983).

Аллофибробласты получали по существующим стандартным протоколам (Терехов С.М., 1981). Фибробласты переводили в суспензионное состояние с концентрацией клеток $2\times10^6$ кл/мл, ресуспендировали в эмбриональной сыворотке КРС. К подготовленной суспензии добавляли равный объем 20% раствора ДМСО на эмбриональной сыворотке. Подготовленную суспензию помещали в криопробирки фирмы «Nunc». Замораживание фибробластов проводили по 3-х этапной программе: от комнатной температуры до -40°С со скоростью 1°С/мин; от -40°С до -80°С со скоростью 10°С/мин; дальнейшее погружение в жидкий азот. Программное замораживание образцов осуществляли на программном замораживателе «Cryosan» (Германия). Замороженные образцы хранили при температуре -196°С, а их отогрев проводили на водяной бане при температуре 41°С в течение 3-4 мин.

В качестве носителей для аллофибробластов были выбраны деградирующая коллагеновая губка «Геласпон» (Хилькин А.М., 1974) и метилцеллюлозный (МЦ) гель (Гончарук О.І., 2004).

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Для получения статистических выводов, после того, как непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа (критерий Краскала-Уолиса) выявлял различия между экспериментальными группами, применяли критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони (использовали стандартный пакет статистических программ «Statistica 6.0»).

Ранее нами был показан стимулирующий эффект применения нативных и криоконсервированных аллофибробластов на скорость заживления кожных ран, о чем свидетельствуют результаты гистологических исследований (Абрафикова Л.Г., 2010). В настоящей работе установлено, что изменения показателей острой фазы воспаления коррелируют с результатами процессов заживления кожных дефектов.

Гликопротеиды — это полимеры, состоящие из белкового стержня и ковалентно связанных с ним углеводных компонентов (С.И. Шевченко, 2000). Значение гликопротеидов в воспалительном процессе также очень велико. Воспаление характеризуется нарушением местного крово- и лимфообращения. Прикрепление лейкоцитов к сосудистой стенке объясняется тем, что ее внутренняя оболочка при воспалении покрывается хлопьевидным слоем, в состав которого входит фибрин, гликозаминогликаны, гликопротеиды, сиаловые кислоты и др.

Таблица 1.

Содержание гликопротеидов в сыворотке крови при различных способах лечения ран у лабораторных крыс

| Вариант | Содержание гликопротеидов, г/л | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 сутки | 7 сутки | 14 сутки | 21 сутки |
| | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ |
| I | 0,34±0,13 | - | - | - |
| II | 0,53±0,02[1] | 0,69±0,023[1] | 0,51±0,03[1] | 0,46±0,026[1] |
| III | - | 0,67±0,02[1,2] | 0,47±0,02[1,2] | 0,42±0,02[1,2] |
| IV | - | 0,49+0,017[1,2,3] | 0,40+0,01[1,2,3] | 0,33±0,02[1,2,3] |
| V | - | 0,68±0,035[1] | 0,48±0,02[1,2] | 0,40±0,02[1,2] |
| VI | - | 0,42±0,01[1,2,4] | 0,38±0,02[1,2,4] | 0,37±0,04[1,2,4] |

Примечания: I - контроль, интактные животные; II - контроль, без лечения; III - нанесение МЦ геля; IV - нанесение криоконсервированных фибробластов в МЦ геле; V - нанесение губки «Геласпон»; VI – нанесение криоконсервированных фибробластов на губке «Геласпон». [1] - различия достоверны по сравнению с контролем I; [2] – различия достоверны по сравнению с контролем II соответствующих сроков; [3] - различия варианта III достоверны по сравнению с вариантом IV соответсвующих сроков; [4] - различия варианта V достоверны по сравнению с вариантом VI соответсвующих сроков.

Концентрация гликопротеидов начинала возрастать через 24 часа от начала воспаления. В сыворотке животных контрольной группы к моменту формирования ран уровень гликопротеидов (Гл) возрастал в 1,6 раз по сравнению с сывороткой интактных животных (табл. 1). К 7 суткам уровень Гл возрастал в 2,0 раза. На 14 - 21 сутки концентрация этого острофазового белка постепенно снижалась, достигая нормы к 25 суткам. При аппликации на раны МЦ геля и губки «Геласпон» без фибробластов уровень Гл в сыворотке на 7 сутки достоверно не отличался от показателей Гл в сыворотке нелеченых животных. К 14 суткам уровень Гл достоверно снижался в подопытных группах, которым наносили криоконсервированные фибробласты, независимо от применяемого носителя. На 21 сутки норма Гл была отмечена только у животных, которым наносили криоконсервированные фибробласты в МЦ геле. У животных, на раны которых наносили губку «Геласпон» с криоконсервированными фибробластами, показатель Гл был незначительно выше нормы, но различия достоверны.

Церулоплазмин (ЦП) является главным транспортным белком меди, обладающим способностью окислять субстрат или вести его восстановление, в частности, катализировать восстановление молекулярного кислорода до воды. ЦП принимает участие в удалении железа освобождающегося из гемоглобина разрушенных эритроцитов в месте воспаления, препятствует участию этих элементов в метаболизме патогенов. ЦП устраняет свободные радикалы внеклеточно и может защищать клетки от перекисного окисления липидов, вызванного супероксидами и другими радикалами. Уровень ЦП в сыворотке крови возрастает через 48 часов, после нанесения травмы организму и развития воспалительного процесса (Алексеева Н.М., 1991).

Уровень (ЦП) возратал через 48 часов после развития воспалительной реакции. К моменту формирования ран в группе животных, не получавших лечение, уровень ЦП возрастал в 1,8 раза по сравнению с нормой (табл. 2). На 7 сутки этот показатель возрастал в 2,5 раза. Снижение уровня ЦП в сыворотке крови начиналось на 21 сутки, показатели ЦП вернулись к норме к 30 суткам. При использовании аппликации МЦ геля без фибробластов уровень ЦП был достоверно ниже, чем в группе животных без лечения на протяжении всего срока наблюдения с 7 - 21 сутки, но превышал показатели контрольной группы животных. При внесении криоконсервированных фибробластов в МЦ геле на 14 и 21 сутки содержание ЦП соответствовало норме. При использовании в качестве носителя губки «Геласпон» показатель ЦП возвращался к норме к 25 суткам.

Серомукоид – это углеводно-белковый комплекс плазмы крови, который является показателем белкового обмена. Серомукоиды входят в состав плотной и рыхлой соединительной ткани организма. В случае разрушения, деградации или повреждения последней серомукоиды поступают в плазму крови (Бышевский А.Ш., 1995).

Концентрация серомукоидов в сыворотке крови крыс контрольной группы на момент формирования кожного дефекта возрастала в 5,5 раз по сравнению с концентрацией серомукоидов в сыворотке крови интактных крыс (табл.3). На 7 сутки в группе со спонтанным заживлением, в группах с нанесенными МЦ гелем и коллагеновой губкой «Геласпон» содержание серомукоидов в сыворотке крови крыс продолжало оставаться таким же, как и в день формирования дефектов. В группах крыс, которым на дефект кожи наносили криоконсервированные фибробласты, иммобилизованные в МЦ геле и на коллагеновой губке «Геласпон», показатели содержания серомукоидов снижались и превышали показатели нормы соответственно в 2,4 и 3,7 раз. На 14 сутки содержание серомукоидов в сыворотке крови крыс в группе с самопроизвольным заживлением и с коллагеновой губкой «Геласпон» превышало соответственно в 2,01 и 1,7 раза. На 21 сутки содержание серомукоидов в сыворотке крови крыс во всех группах восстанавливалось до значений нормы.

Таблица 2.

Содержание церулоплазмина в сыворотке крови при различных способах лечения ран у лабораторных крыс

| Ва-ри-ант | Содержание церулоплазмина, мг/л | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 сутки | 7 сутки | 14 сутки | 21 сутки | 25 сутки |
| | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ |
| I | 278,5±18,4 | - | - | - | - |
| II | 497,3±25,2[1] | 689,3±22,1[1] | 539,5±25,3[1] | 438,5±26,1[1] | 412,4±25,9[1] |
| III | - | 595,0±21,7[1,2] | 479,8±29,2[1] | 402,3+20,4[1,2] | 325,6±16,7[1,2] |
| IV | - | 433,3±22,9[1,2,3] | 276,5±20,2[1,2,3] | 279,5±22,0[1,2,3] | 276,7±13,8[1,2,3] |
| V | - | 582,67±24,2[1,2] | 507,67±19,9[1,2] | 397,8±14,3[1,2] | 300,1±21,4[1,2] |
| VI | - | 605,67±15,2[1,2,4] | 475,8±20,5[1,2,4] | 403,5±12,4[1,2,4] | 280,5±14,5[1,2,4] |

Примечания: I - контроль, интактные животные; II - контроль, без лечения; III - нанесение МЦ геля; IV - нанесение криоконсервированных фибробластов в МЦ геле; V - нанесение губки «Геласпон»; VI - нанесение криоконсервированных фибробластов в губке «Геласпон». [1] - различия достоверны по сравнению с контролем I; [2] – различия достоверны по сравнению с контролем II соответствующих сроков; [3] - различия варианта III достоверны посравнению с вариантом IV соответсвующих сроков; [4] - различия варианта V достоверны по сравнению с вариантом VI соответсвующих сроков.

Все исследованные в работе концентрации положительных реактантов острой фазы воспаления достоверно повышались в несколько раз в день формирования кожных дефектов. Это свидетельствовало о прямой связи этих неспецифических факторов, как части системного ответа, с местными процессами, происходящими в зоне асептического воспаления кожи. Динамика изменения концентраций белков острой фазы воспалительного процесса показывает особенности различий в течение воспалительной реакции и восстановления гомеостатического баланса в различных экспериментальных группах проводившихся исследований. При этом были выявлены различия связанные не только с фазами регенеративных процессов в кожных дефектах, но и обусловленные взаимодействием самих факторов с иммуно-регуляторными реакциями организма крыс. Особенно наглядно это демонстрировали показатели в группах крыс, которым на кожные дефекты наносили препараты фибробластов. Биологически активные вещества, которые продуцируют жизнеспособные фибробласты в месте повреждения, оказывают стимулирующее действие на регуляторные системы организма, в первую очередь на иммунную, что положительно сказывается на скорости течения воспалительной реакции. Установлено, что динамика выраженности показателей острой фазы воспаления коррелирует с гистоморфологическими изменениями в тканях после внесения в кожный дефект фибробластов.

Таблица 3.

Содержание серомукоидов в сыворотке крови при различных способах лечения ран у лабораторных крыс

| Вариант | Содержание серомукоидов, мг/л | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 сутки | 7 сутки | 14 сутки | 21 сутки | 25 сутки |
| | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ | $\overline{X} \pm S\overline{x}$ |
| I | 4,55±0,32 | - | - | - | - |
| II | 24,8±0,71* | 23,45±1,43* | 9,17±0,69* | 6,67±0,35 | - |
| III | - | 23,78±1,78* | 6,67±0,50 | 6,67±0,36 | - |
| IV | - | 10,93±0,33* | 4,38±0,33 | 4,33±0,36 | - |
| V | - | 22,15±2,21* | 7,88±0,71* | 5,95±0,44 | 4,60±0,32 |
| VI | - | 16,83±1,67* | 7,20±0,7 | 4,76±0,32 | - |

Примечания: I - контроль, интактные животные; II - контроль, без лечения; III - нанесение МЦ геля; IV – нанесение криоконсервированных фибробластов в МЦ геле; V - нанесение губки «Геласпон»; VI– нанесение криоконсервированных фибробластов в губке «Геласпон». * - различия статистически достоверны по отношению к интактной группе крыс ($p < 0,05$).

Также было показано, что изменения показателей концентрации белков острой фазы воспаления, указывают на преимущества МЦ геля в качестве носителя для фибробластов перед коллагеновой губкой «Геласпон».

### Литература

1. Бодун Р.Д. На пути к созданию живого дермального эквивалента / Р.Д. Бодун, Н.В. Островский, А.Б. Шиповская и др. // Бюл. Волгоградского Научного Центра РАМН. 2008. №1. С. 37-38.

2. Родовилов Б.Б., Новожилов А.А. Применение биологических покрытий в комплексном лечении ран различной этиологии / Б.Б. Родовилов,. А.А. Новожилов // Ведущий многопрофильный госпиталь страны: основные функции, достижения и направления развития: международная научно-практическая конференция к 300-летию ГВКГ им. акад. Н.Н.Бурденко: тезисы докл. М., ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко: 2006. С. 59-60.

3. Сыгеников И.А., Николаев А.В., Шехтер А.Б. и др. Лечение ран коллагеновыми препаратами // Хирургия. 1979. № 3. С. 31-38.]

4. Абрафикова Л.Г., Петренко Т.Ф., Высеканцев И.П., Грищенко В.И. Влияние нативных и криоконсервированных аллофибробластов на процессы регенерации кожных язв у крыс // Запорожский медицинский журнал. 2010. №2. С. 5-8.

5. Иммунитет и воспаление. Механизмы развития с клиническим отражением: методическое пособие. Ч.1. / сост. С.И. Шевченко, Э.Н. Иванов, В.А. Питько. Харьков: ХГМУ, 2000. 32с.

6. European convention for the protection of vertebrate animals used experimental and other scientific purpose: Council of Europe 10.03.86. Strasburg, 1986. 52 p.

7. Семенів Д.В. Вплив мазі з олією аронії чорноплідної на патогенез ранового процесу / Д.В. Семенів // Клінічна фармація. 2009. Т.13, №3. С. 35-38.

8. Западнюк И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте: [монография] / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, В.А. Захария, Б.В. Западнюк. К.: Вища школа, 1983. 383с.

9. Терехов С.М. Усовершенствованный метод клонирования диплоидных фибробластов человека // Цитология. 1981. Т. 23, №6. С. 717 – 718

10. Хилькин А.М. Использование коллагеновой гемостатической губки для закрытия раневой поверхности печени в эксперименте. / Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Леменев В.Л. [и др.] // Экспериментальная хирургия.– 1974. № 6. С. 38-41.

11. Пат. 64540 Україна МПК A61K35/48. Препарат Ембріогель для зовнішнього застосування та спосіб його отримання / Гончарук О.І., Кощий С.В., Петренко Т.П., Гапон А.А., Ревенко О.Б., Грищенко В.І. заявитель и патентообладатель ИПКиК НАН Украины. – №2003065810; заявл. 24.06.03; опубл.16.02.04, Бюл.2.

12. Иммунитет и воспаление. Механизмы развития с клиническим отражением: методическое пособие. Ч.2. / [сост. С.И. Шевченко, Э.Н. Иванов, В.А. Питько]. Харьков: ХГМУ, 2000. 31с.

13. Алексеева Н.М. Изменение активности церулоплазмина в сыворотке крови под воздействием различных факторов / Н.М. Алексеева / / Гигиена и санитария. 1991. №8. С. 70-71.
14. Бышевский А.Ш. Коагуляционный гемостаз у беременных с токсикозом и влияние на него витаминов антиоксидантов / А.Ш. Бышевский //Акушерство и гинекология. 1995. №2. С.41.

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО РЕЖИМА ОХЛАЖДЕНИЯ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ *Candida albicans*

**Артуянц А.Ю., Абрафикова Л.Г., Пишко О.В., Высеканцев И.П.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*
E-mail: nastya.sir@gmail.com

Дрожжеподобные грибы рода *Candida,* являясь низшими эукариотами с непродолжительным циклом деления, представляют собой удобную модель для изучения криоповреждения, криозащиты и репарации криоповреждения биологических объектов. В тоже время грибы этого рода являются условно-патогенными микроорганизмами, которые вызывают местные и системные заболевания у людей с ослабленным иммунитетом. Существующие на сегодня средства специфической профилактики кандидозов недостаточно эффективны. Выбор антимикотических препаратов ограничен. Часто встречаются штаммы, резистентные к большинству антимикотических препаратов (Шевяков М. А., 2000). В связи с этим большое значение имеет проблема создания коллекций штаммов грибов *Candida*. Эти коллекции необходимы для эпидемиологического мониторинга участия различных видов грибов рода *Candida* в патогенезе заболеваний, для разработки новых антифунгальных препаратов и препаратов для специфической профилактики. Как известно, криоконсервирование – наиболее эффективный метод хранения большинства видов микроорганизмов, а также других биологических объектов (Пушкарь Н.С., 1981). В настоящее время отработаны режимы криоконсервации для целого ряда видов и штаммов микроорганизмов, но универсальных способов криоконсервации нет. Наличие оптимальных условий замораживания для каждого вида клеток объясняется созданной P. Mazur двухфакторной теорией криоповреждения (Mazur P., 1972). Данная теория объясняет почему значения оптимальной скорости существенно различаются для разных клеток и позволяет, зная геометрические и транспортные характеристики клеточных мембран, предсказать, с какой скоростью необходимо охлаждать те или иные клетки, чтобы добиться их максимальной сохранности в процессе криоконсервирования (Thirumala S., 2005; Woelders H., 2004). Подбор эффективных условий замораживания, в соответствии с этой теорией, требует экспериментального определения режимов охлаждения и состава криозащитных сред, включая вид и концентрацию криопротекторов, т.к. влияние этих факторов в значительной мере зависит от видовых особенностей строения и биологических свойств клеток.

Целью работы являлась разработка эффективных условий криоконсервирования дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Для достижения поставленной цели необходимо было теоретически оценить эффективную с точки зрения двухфакторной теории криоповреждения скорость охлаждения, экспериментально изучить влияние скоростей охлаждения при замораживании клеток *C.albicans* на их жизнеспособность.

Объектом исследования являлись дрожжеподобные грибы *Candida albicans* АТСС 885 (штамм из коллекции ГП «НИИ дерматологии и венерологии АМН Украины» г. Харьков).

Грибы выращивали на скошенном сусло-агаре, затем переводили в жидкую среду и культивировали с аэрацией до стационарной фазы роста (Биргер М.О., 1967). Теоретическую оценку эффективной скорости охлаждения замораживаемой клеточной суспензии проводили с использованием алгоритма, описанного в (Кулешова Л.Г., 2008; Thirumala S., 2005). Форму клеток аппроксимировали растянутым эллипсоидом вращения. Линейные размеры эллипсоидов (длина большой оси $a$ и длина малой оси $b$) определяли с помощью программы AxioVision Rel. 4.6 по микрофотографиям клеток *C.albicans*, полученным на микроскопе LSM 510 meta в оптическом режиме. Площадь поверхности клеток $S$, их объем $V$ и поверхностно-объемное отношение клеток $\gamma$ вычисляли по следующим формулам, которые связывают эти параметры с линейными размерами клеток:

$$S = \frac{\pi b}{2}\left[b + \frac{a^2}{\sqrt{a^2 - b^2}}\arcsin\left(\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}\right)\right], \quad V = \frac{1}{6}\pi a b^2, \quad \gamma = \frac{S}{V}.$$

Коэффициент фильтрации мембран дрожжеподобных грибов определяли волюмометрическим методом (Сакун О.В., 2009). Для изучения влияния различных скоростей охлаждения клетки *C.albicans* помещали в криопробирки «Nunc». В качестве среды консервирования использовали среду на основе сусла пивного с добавлением до конечной концентрации 5% и 10% ДМСО, глицерина и этанола. Суспензию грибов *C.albicans* замораживали со скоростями 0,25, 1, 3,5, 7, 10, 20 и 35°C/мин до –40°C в программном замораживателе «Cryoson» (Германия) с дальнейшим погружением в жидкий азот. Часть образцов замораживали путем погружения в жидкий азот. Образцы хранили в течение четырех лет в низкотемпературном банке ИПКиК НАН Украины. Контролем служили клетки, которые не подвергали криоконсервированию. Размораживание образцов проводили на водяной бане при температуре 30°С. Жизнеспособность грибов определяли «чашечным методом» Коха (Луста К.А., 1990).

Статистическую обработку экспериментальных результатов осуществляли стандартным методом с использованием t-критерия Стьюдента при вероятности попадания в доверительный интервал $p \leqslant 0{,}05$, а также с помощью пакета прикладной компьютерной программы «Statistica v6.0».

Для определения осмотически неактивного объема клеток *C.albicans* аппроксимировали экспериментально полученные данные о линейной зависимости объема клеток в водных растворах хлорида натрия с концентрациями 0,15, 0,3, 0,6 и 1,2М:

$$\frac{V}{V_0} = \alpha + \frac{\pi_0^{in}(1-\alpha)}{\pi^{out}}$$

где $V$ – текущее значение клеточного объема,

$V_0$ – начальное значение клеточного объема,

$\alpha$ – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ,

$\pi^{out}$ – осмотическое давление растворенного вне клетки вещества,

$\pi_0^{in}$ – исходное (до начала кристаллизации клеточной суспензии) осмотическое давление внутриклеточного раствора.

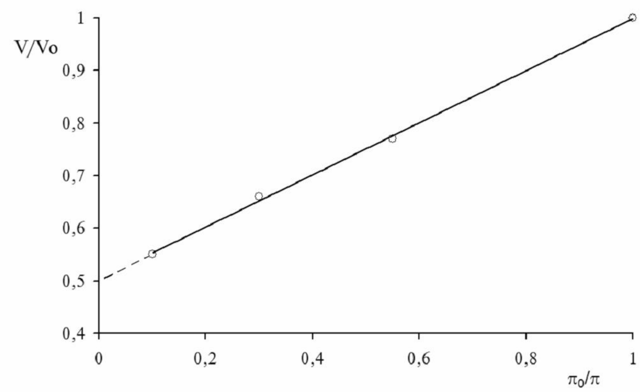



Рис. 1. Зависимость относительного объема клеток *C.albicans* от обратного приведенного осмотического давления внеклеточного водного раствора хлорида натрия.

Значение осмотически неактивного объема для клеток получали как координату пересечения оси ординат с указанной линейной зависимостью (рис.1).При определении коэффициента фильтрации мембран волюмометрическим методом клетки помещали в 1М водный раствор диметилсульфоксида, и определяли кинетику изменения объема клеток при температурах 25°С и 10°С с помощью микроскопа Axio Observer Z1 **.**

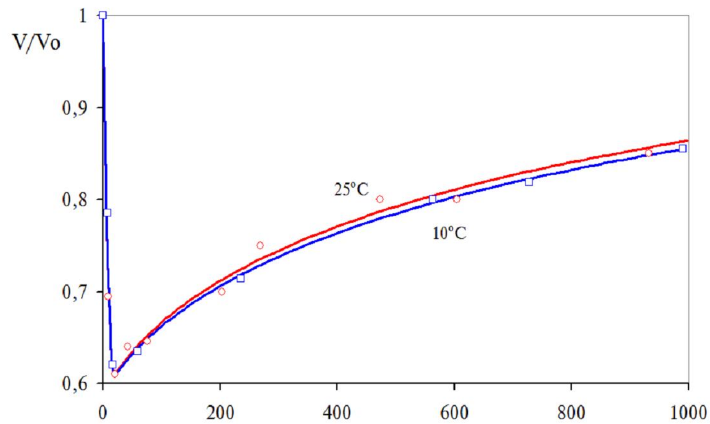



Рис. 2. Экспериментальная (точки) и теоретическая зависимость относительного объема клеток *C.albicans* от времени экспозиции в 1М растворе диметилсульфоксида.

Экспериментально определенные зависимости объема клеток от времени при их контакте с раствором криопротектора аппроксимировали численными решениями уравнений Кедем-Качальского (Kedem O., 1958), подбирая значение коэффициента фильтрации клеточной мембраны таким образом, чтобы достичь максимального совпадения между экспериментальными и теоретическими зависимостями (рис. 2) при заданных, определенных ранее средних значениях поверхностно-объемного отношения и осмотически неактивного объема клеток.

Величину энергии активации процесса переноса молекул воды через клеточную мембрану определили по наклону линейной зависимости $\ln L_p$ от $1/T$ (график Аррениуса), где $L_p$ – коэффициент фильтрации клеточной мембраны, $T$ – абсолютная температура.

Определенное таким образом значение коэффициента фильтрации составило $(2,41 \pm 0,06) \cdot 10^{-14}$ м³/Нс при температуре 25°С, а энергия активации трансмембранного переноса молекул воды – $E = 25,2 \pm 1,6$ кДж/моль.

Кривую плавления водного раствора диметилсульфоксида приближенно можно представить в виде (Thirumala S., 2005)

$$\frac{c}{c_0}\left(\frac{T}{T_0}\right) = -83,595\left(\frac{T}{T_0}\right)^2 + 125,95\frac{T}{T_0} - 41,355,$$

где $T$ – абсолютная температура,

$T_0$ – температура, при которой завершается плавление внеклеточного раствора,

$c$ – текущая концентрация замораживаемого внеклеточного раствора,

$c_0$ – начальная (до начала кристаллизации) концентрация криозащитного раствора.

В случае, когда через плазматическую мембрану клетки проникают только молекулы растворителя, то есть воды, изменение концентрации растворенных внутри клетки веществ при постоянной скорости охлаждения $\beta$ описывается уравнением (Woelders H., 2004)

$$\frac{d\left(\frac{c_{in}}{c_0}\right)}{d\left(\frac{T}{T_0}\right)} = -\frac{T_0\left(\frac{c_{in}}{c_0}\right)^2 exp\left[\frac{E}{R\ T_0}\left(1-\frac{T_0}{T}\right)\right]}{\left(1-\alpha\right)\beta}\gamma L_P\left(T_0\right)\pi_0\left[\frac{c}{c_0}\left(\frac{T}{T_0}\right)-\frac{c_{in}}{c_0}\right],$$

(1)

где $R$ – универсальная газовая постоянная,

$\gamma$ – поверхностно – объемное отношение клетки,

$\pi_0$ – осмотическое давление физиологического раствора,

$c_{in}$ – текущая концентрация внутриклеточного раствора

Вероятность повреждения клеток *C.albicans* за счет внутриклеточной кристаллизации в зависимости от скорости охлаждения клеточной суспензии на этапе кристаллизации определяется интегралом (Марущенко В.В., 2009)

$$W = \frac{1}{\beta}\int_{1}^{\frac{T_e}{T_0}} d\left(\frac{T}{T_0}\right)\frac{\left[\frac{c}{c_0}\left(\frac{T}{T_0}\right)-\frac{c_{in}}{c_0}\right]^2}{A} exp\left\{-\frac{B}{\left(\frac{T}{T_0}\right)^3\left[\frac{c}{c_0}\left(\frac{T}{T_0}\right)-\frac{c_{in}}{c_0}\right]^2}\right\},$$

(2)

где $T_e$ – эвтектическая температура внеклеточного раствора,

$\beta$ – скорость охлаждения,

$A$, $B$ – константы, значение которых оценено в работе (Сакун О.В., 2009)

На рис. 3 представлена зависимость процента поврежденных за счет внутриклеточного льдообразования клеток *C.albicans* от скорости охлаждения на этапе кристаллизации клеточной суспензии, построенная по равенству (2) с учетом определенных нами транспортных и геометрических характеристик исследуемых клеток и численных решений уравнения (1).

В соответствии с двухфакторной теорией криоповреждения оптимальной является максимальная скорость охлаждения, при которой внутриклеточные кристаллы льда не образуются. Из расчетной зависимости, представленной на рис. 3, видно, что значение эффективной скорости охлаждения при замораживании дрожжеподобных грибов *C.albicans* составляет около 7°С/мин.


Рис. 3. Расчетная зависимость доли клеток *C.albicans*, поврежденных в результате внутриклеточной кристаллизации от скорости охлаждения при замораживании суспензии в 5%-ном водном растворе диметилсульфоксида.

Для подтверждения этих расчетов была изучена жизнеспособность клеток дрожжеподобных грибов *C.albicans* после замораживания с различными скоростями и в различных криозащитных средах. Максимальную жизнеспособность обеспечивало замораживание со скоростями от 3,5°С/мин до 7°С/мин в пивном сусле с добавлением 5% ДМСО или 5% глицерина. Жизнеспособность клеток в образцах, замороженных со скоростью 3,5°С/мин под защитой 5%ДМСО составляла 92% от контроля; с добавлением в среду консервирования 5% глицерина она составляла 81%. Жизнеспособность клеток в образцах, замороженных со скоростью 7°С/мин с добавлением в среду консервирования 5%ДМСО составляла 83% от контроля; при добавлении в среду консервирования 5% глицерина она составляла 77% от контроля. В диапазоне скоростей охлаждения от 0,25°С/мин до 3,5°С/мин клетки в образцах находятся под более длительным и сильным воздействием неблагоприятных факторов, что приводило к минимальной жизнеспособности, независимо от состава криозащитной среды. Спад жизнеспособности наблюдали и при повышении скорости охлаждения от 20°С/мин до 35°С/мин, что объясняется тем, что при этих скоростях охлаждения клетки уже не успевали достаточно обезводиться.

Было также установлено, что при последующем хранении в течение четырех лет (срок наблюдения) дополнительная гибель клеток не происходила.

Таким образом, полученные экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретической оценкой эффективной скорости охлаждения.

**Литература**


1. Шевяков М. А. Кандидоз слизистых оболочек пищеварительного тракта / М. А. Шевяков // Проблемы медицинской микологии. 2000. Т. 2, № 2. С. 6–10.
2. Актуальные проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н.С.Пушкаря и А.М. Белоуса. К.: Наукова думка. 1981. 608 с.
3. Mazur P. A two-factor hypothesis to freezing hamster tissue-culture cells / P. Mazur, S.P. Leibo, E.H. Chu // Experim. Cell Research. 1972. V. 71, № 2. P. 345– 355.
4. Thirumala S. A simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems /S. Thirumala, R.V. Devireddy // J. Biomech. Eng. 2005. V.127, №2. P.295– 300.
5. Woelders H. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes / H.Woelders, A.Chaveiro // Cryobiology. 2004. V.49, №3. P.258–271.
6. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер. М.: Медицина. 1967. 463 с.
7. Кулешова Л.Г. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий / Л.Г. Кулешова, И.Ф. Коваленко // Биофиз. вестник. 2008. Вып.20, № 1. С. 56–64.
8. Сакун О.В. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двох факторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії / О.В. Сакун, О.І. Гордієнко // Біофіз.Вісн. 2009. Вип.22, №1. С. 123– 129.
9. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К. Ерошина // ОНТИ НЦБИ АН СССР. Пущино. 1990. 186 с.

# ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ИНЕРТНЫХ ГАЗОВ И ИХ СМЕСЕЙ

**Артюхов И.В.**
*Научно-технический центр криобиологии и анабиоза*
*г.Москва*
E-mail: scidep@ntckba.ru

**Аннотация.** Обсуждаются предположительные механизмы криопротекторного действия инертных газов. Обосновывается возможность использования их, их смесей и комбинаций с традиционными криопротекторами для сохранения биологических объектов и материалов, в частности, донорских органов для трансплантации. Намечаются направления дальнейших исследований.

**Введение в проблематику.** В настоящее время значительное количество серьёзных заболеваний (включая травмы) может быть вылечено с использованием трансплантации донорских органов взамен поражённых. Основными ограничениями при этом являются как общая нехватка органов для трансплантации, так и трудность подбора подходящего для конкретного пациента донорского органа. Последняя проблема связана с очень коротким сроком, в течении которого орган сохраняет жизнеспособность и пригоден для трансплантации. Этот срок составляет от нескольких часов до (в случае почки) одного, максимум двух дней. За это время чрезвычайно трудно в экстренном порядке подобрать более или менее совместимую пару донор-реципиент, подготовить реципиента к тяжёлой операции, практически невозможно проверить орган на различные инфекции.

Эту проблему можно было бы решить, если бы удалось продлить период сохранения органа в жизнеспособном состоянии как минимум, до месяцев, желательно – неограниченно долго. Это позволило бы создать сеть банков органов, подбирать каждому пациенту именно те органы и ткани, которые не отторгались бы его организмом, заранее без спешки проверять их на все значимые инфекции.

Такое сохранение возможно организовать с использованием глубокого охлаждения биологических объектов и материалов. На практике хорошо отработано криосохранение клеток, небольших сегментов тканей, эмбрионов человека. Для защиты их от повреждающего действия холода используются вещества-криопротекторы. Однако, существуют значительные трудности при криосохранении более крупных объектов – таких, как органы. В частности, использование традиционных криопротекторов (глицерин, ДМСО и др.) требует применения таких высоких концентраций, которые сами по себе обладают высокой токсичностью.

Ещё в 60-е годы XX века было предложено использовать в качестве криопротекторов инертные газы, в первую очередь, ксенон. Очевидным их преимуществом является сама химическая инертность – и, как следствие, отсутствие токсичности.

**Механизмы криопротекторного действия инертных газов.** Существует несколько механизмов повреждающего действия холода на живые клетки и ткани. Основные из них:

1. Повреждение клеток (и, в меньшей мере, внеклеточного матрикса тканей) образующимися кристаллами льда. Этот механизм повреждения считается наиболее значимым; именно для ингибирования образования и роста кристаллов используются криопротекторы.
2. Фазовый переход жидкий кристалл – гель в фосфолипидных мембранах клеток. Этот переход обратим, но при нём мембрана натягивается, становится более толстой и жёсткой (хрупкой), что может привести к её механическому повреждению, в том числе, и кристаллами льда.
3. Денатурация белковых молекул. Она происходит как под действием собственно охлаждения, так и в результате дегидратации и воздействия возрастающих концентраций электролитов.

Использование инертных газов (конкретно, ксенона) в качестве криопротекторов впервые, видимо, было предложено Р. Прегодой ещё в 60-е годы XX века [1]. В последующие годы эта идея не привлекала большого внимания, и количество исследований в этом направлении было небольшим [2-4]. Практически всеми авторами высказывалось предположение, что криопротекторные свойства ксенона объясняются образованием кристаллогидрата ксенона, которое конкурирует с образованием кристаллов льда. Однако, никто до сих пор не показал, что кристаллы гидрата ксенона повреждают клетки и ткани меньще, чем кристаллы льда. Кроме того, криопротекторные свойства ксенона проявлялись уже при концентрациях, заведомо много меньших, чем необходимые для образования кристаллогидратов [3].

Нам представляется, что криопротекторные свойства ксенона могут объясняться следующими (не взаимоисключающими) механизмами:

- Меньшим повреждающим действием кристаллов гидрата ксенона по сравнению с кристаллами льда которое, возможно, связано с различием в форме тех и других кристаллов (кристаллы льда могут иметь игловидную форму).
- Образованием не кристаллического, а аморфного гидрата ксенона (существование аморфной формы гидрата продемонстрировано для другого газа – метана). Аморфные гидраты могут образовываться при значительно

меньших концентрациях газов, чем те, которые необходимы для образования кристаллогидратов.

- Накоплением молекул ксенона в рыхлом слое на границе вода-лёд, замедляющим рост кристаллов льда (Ice Blocking).
- Мембранопротекторным действием ксенона. Предполагается, что гидрофобные молекулы ксенона могут накапливаться в мембранах клеток, понижая температуру их фазового перехода и увеличивая механическую эластичность мембран.
- Ингибирование денатурации белков. Это может быть обусловлено повышением стабильности белковых молекул за счёт накопления молекул ксенона в гидрофобных «карманах» белков.

Нами был проведён большой объём вычислений с целью молекулярного моделирования взаимодействия молекул ксенона с водой и льдом при температурах вблизи 0°C и ниже. Методика моделирования и полученные результаты подробно описаны в работе []. Здесь мы приведём основные полученные выводы:

1. Растворимость ксенона в воде очень быстро возрастает с понижением температуры.
2. Гидратация ксенона происходит путём формирования кластеров $Xe{\cdot}H_2O_n$, где в среднем n   21.5.
3. С возрастанием концентрации ксенона и с понижением температуры вязкость раствора возрастает. При температурах ~255–250°K вязкость растворов ксенона становится настолько высокой, что за время расчёта (~100 nsec) термодинамические параметры системы не успевают прийти к равновесию; это позволяет предположить возможность витрификации раствора при достаточно низких температурах, однако моделирование этого процесса потребует многократно больших расходов вычислительного времени.
4. При достаточно высоких (>~3% mol) концентрациях растворённого в воде ксенона и температурах вблизи 0°C наблюдается очень быстрая (через ~20 nsec) гомогенная нуклеация клатратного кристаллогидрата ксенона со структурой sI (что соответствует экспериментальным данным).
5. Ни в одном случае за время моделирования (до 100 nsec и больше) не наблюдалось гомогенной нуклеации льда; в тех случаях, когда в системе присутствовал как лёд, так и кристаллогидрат ксенона, рост кристаллов последнего происходил многократно быстрее.
6. В ряде случаев наблюдалось образование метастабильной аморфной структуры с высоким (~6% mol) содержанием ксенона; парадоксальным образом этот аморфный гидрат ксенона кажется тем более

устойчивым по отношению к образованию кристаллического гидрата, чем ниже температура.

7. При моделировании двухфазной системы ($H_2O$+Xe)/лёд (рис. 1) температура равновесия жидкость/лёд снижалась примерно на 1°C на каждый процент ксенона, что соответствует криоскопическому закону.

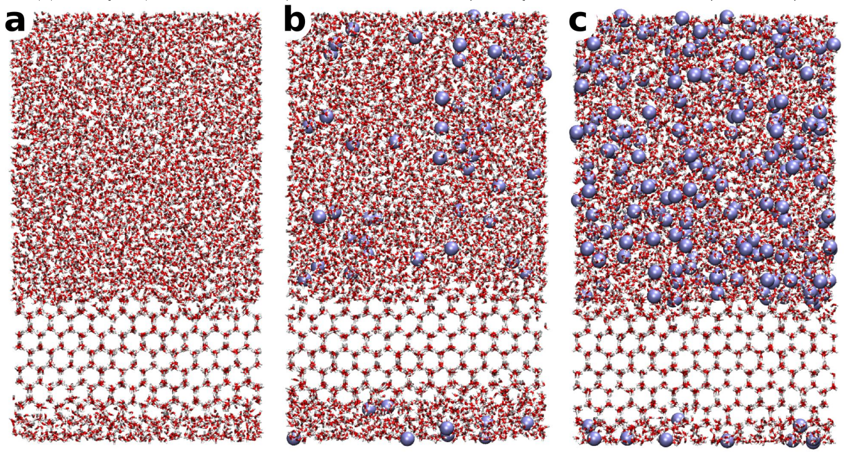



Рис. 1. Равновесные состояния системы жидкость/лёд при концентрациях ксенона (a) 0%, (b) 1% и (c) 4%. Атомы кислорода показаны точками, ксенона – большими шариками.

8. Мы наблюдали некоторое накопление молекул ксенона в пограничном слое вода-лёд (рис. 2), однако это не приводило к заметному замедлению роста кристалла льда, что противоречит гипотезе о связи криопротекторного действия ксенона с замедлением роста кристаллов льда по механизму Ice Blocking.

9. При температурах ниже равновесной наблюдается рост кристалла льда. Он происходит до тех пор, пока концентрация ксенона в оставшейся воде не станет достаточно высокой, после чего там происходит гомогенная нуклеация кристаллогидрата либо не образуется аморфный гидрат, после чего рост кристалла льда останавливается (рис. 3).

Таким образом, использование инертных газов в качестве криопротекторов может позволить затормозить образование и рост кристаллов льда и, возможно даже, достичь витрификации живой ткани. Для этого могут потребоваться весьма высокие их концентрации, но в силу самой инертности газов они не будут обладать токсичностью и могут быть использованы в нужных концентрациях; требующиеся для этого давления не слишком высоки и не приведут к снижению жизнеспособности клеток и тканей.

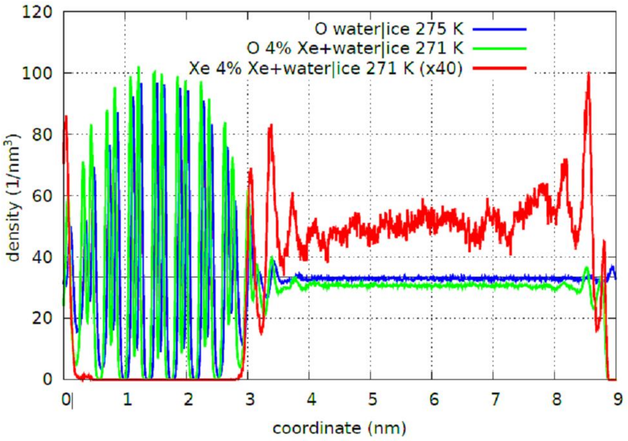



Рис. 2. Распределение атомов кислорода (синий и зелёный цвета) и ксенона (красный цвет; масштаб по шкале Y увеличен в 40 раз для того, чтобы сопоставить его с плотностью молекул воды) при разных условиях. Слева – кристалл льда (атомы кислорода строго упорядочены; ксенон отсутствует). Справа – жидкая фаза. Видно образование слоёв с повышенной концентрацией молекул ксенона в пограничном слое лёд/жидкость.

Кроме ксенона могут быть использованы и другие инертные газы; их молекулярный размер может оказаться более подходящим для заполнения полостей, образующихся на границе вода-лёд. Также может оказаться выгодным использование смесей инертных газов для оптимального заполнения всего спектра образующихся полостей. Использование отличных от ксенона газов может потребовать применения более высоких (но приемлемых) давлений.

**Направления дальнейших исследований**

Для оптимизации состава газовых смесей и режимов их применения при криосохранении различных органов и тканей должны быть проведены следующие исследования, как теоретические (молекулярное моделирование), так и экспериментальные:

1. Исследование образования гидратов других (кроме ксенона) инертных газов.
2. Исследование образования гидратов с использованием смесей газов.
3. Исследование взаимодействия вода-газ при более низких температурах (потребует бульшего объёма вычислений).

4. Исследование совместного применения газовых и традиционных криопротекторов.
5. Исследование взаимодействия инертных газов с клеточными мембранами.
6. Исследование взаимодействия инертных газов с молекулами белков.

Проведение этих исследований позволит разработать для каждого органа оптимальный состав криопротекторов и режим охлаждения-согревания.

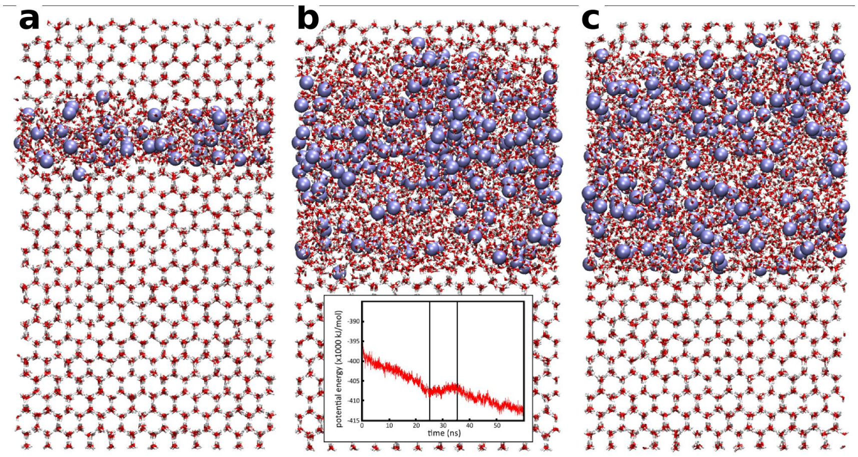



Рис.3. Конечные состояния системы жидкость/лёд при концентрациях ксенона (a) 1%, (b) и (c) 4%. В случаях (a) и (c) образуется слой аморфного гидрата ксенона; в случае (b) происходит гомогенная нуклеация кристаллогидрата, что следует из наличия плато на графике потенциальной энергии системы, показанном на врезке.

**Выводы.** Использование криопротекторов на основе ксенона и других инертных газов (вероятно, в сочетании с другими криопротекторами в малотоксичных концентрациях) может позволить осуществить долговременное – от месяцев до многих десятилетий – сохранение биологических объектов, включая органы для трансплантации. Разработка оптимальных составов криопротекторов и режимов охлаждения-согревания для различных органов потребует большого объёма дальнейших исследований.

**Литература**

1. Artyukhov V.I. et al., «Can xenon in water inhibit ice growth? Molecular dynamics of phase transitions in water–Xe system». В печати.

2. Prehoda, R.W. «Suspended Animation», Chilton Book Company, 1969.
3. Rodin, V.V., F.S. Isangalin, et al. (1984). «Structure of protein solutions in a presence of xenon clathrate». Cryobiology & Cryo-Medicine 14: 3-7.
4. Sheleg, S., H. Hixon, et al. (2008). "Cardiac Mitochondria l Membrane Stability after Deep Hypothermia using a Xenon Clathrate Cryostasis Protocol - an Electron Microscopy Study." International Journal of Clinical and Experimental Pathology 1(5): 440-447.
5. Щербаков П.В., Тельпухов В.И., Николаев А.В. Патент (19) RU(11) 2 268 590 C1 (51) МПК A01N 1/02 (2006.01). Способ криоконсервации органов и тканей in situ.
6. Яковлев Е.И. «Трубопроводный транспорт продуктов разработки газоконденсатных месторождений». М.: Недра, 1990.

## ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА СОХРАННОСТЬ, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОРДОВОЙ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ДМСО И ВРЕМЕНИ ЭКВИЛИБРАЦИИ

**Бабийчук Л.А., Зубова О.Л., Макашова Е.Е., Зубов П.М.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*
E-mail: pmzubov@mail.ru

В настоящее время широкое распространение получило использование стволовых клеток кордовой крови (КК) человека для лечения пациентов при целом ряде онкологических, иммунологических заболеваний, а также гемоглобинопатиях, нарушениях кроветворения и др. патологических состояниях. (Федорова Т.А., 2006). Исходя из этого, существует необходимость создания банков КК и полученных из нее препаратов, что возможно только при условии долгосрочного хранения клеток в замороженном состоянии. Поэтому разработка и оптимизация методов криоконсервирования КК является актуальной проблемой криобиологии и медицины.

Одним из наиболее важных условий успешного криоконсервирования является выбор криопротектора и его концентрации. Наиболее широко используемым криопротектором для замораживания ядросодержащих клеток (ЯСК) КК, в состав которых входят и стволовые гемопоэтические, является диметилсульфоксид (ДМСО) в различных концентрациях. При этом эквилибрация клеточной суспензии с ДМСО способна вызывать нарушения структурно-функциональных и метаболических свойств клеток, приводя к потере их сохранности и жизнеспособности, что обусловлено его высокой токсичностью. Одним из проявлений токсического эффекта может быть накопление высоких концентраций активных форм кислорода (АФК), которые способны привести к инициации апоптоза и гибели клеток как до, так и после криоконсервирования. Поэтому, очень важным является предотвращение их накопления уже на этапе эквилибрации с криопротектором, что позволит избежать или замедлить развитие оксидативного стресса. Это возможно благодаря добавлению к суспензии клеток антиоксидантов, одним из которых является N-ацетил-L-цистеин (АЦ). Первичной функцией АЦ является инактивирование АФК, вызывающих повреждение клеток и апоптоз. Цитопротекторная функция АЦ показана как in vitro при стимуляции различными индукторами оксидативного стресса и токсическими агентами (Chaudhari A.A., 2007), так и in vivo, где он имел положительный терапевтический эффект на заболевания, связанные с развитием оксидативного стресса (Knuckey N.W., 2005).

Исходя из выше сказанного, **целью** работы была оценка сохранности, жизнеспособности и содержания активных форм кислорода в ядросодержащих клетках кордовой крови в зависимости от концентрации ДМСО и времени эквилибрации, а также влияние N-ацетил-L-цистеина на изучаемые параметры.

В работе нами были использованы следующие **материалы и методы**: Использовалась КК человека, полученная после нормальных родов при наличии информированного согласия роженицы. Материал заготавливали на консерванте “CPD”. Выделение фракции ЯСК КК проводили методом седиментации в 6% растворе декстрана с молекулярной массой 60000 (полиглюкин). Подсчет клеток проводили в камере Горяева согласно стандартной методики (Davis J.M., 2002). Для оценки $CD45^+$ - клеток и их жизнеспособности использовали стандартный протокол иммунофенотипирования с использованием CD45FITC и 7AAD (Schmid I., 1992). Результаты измерений оценивали с помощью программного обеспечения фирмы BD - CELLQuest Pro. АФК в клетках определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США) по накоплению высоколюминисцентного 2',7'-дихлорофлуресцеина (DCF). Статистическую обработку результатов проводили методом Стьюдента-Фишера, с использованием программы Excel.

**Результаты и их обсуждение:**

Состояние клеток перед криоконсервированием во многом определяет результат после замораживания-отогрева. Поэтому, изучение сохранности и жизнеспособности клеток до замораживания позволит предвидеть возможные риски для клеток и устранить или снизить негативное влияние стрессорных факторов.

Основным криопротектором, используемым для криоконсервирования ЯСК крови, является ДМСО, представляющий собой небольшую амфифильную молекулу. Несмотря на большое количество исследований, молекулярная основа его действия на клетки еще во многом остается неясной.

В настоящее время различия в протоколах криоконсервирования с использованием ДМСО в основном заключаются в применении его в разных концентрациях с целью снижения токсических эффектов и осмотического стресса клеток с сохранением максимально возможного их количества в функциональном состоянии. Имеющиеся в настоящее время протоколы криоконсервирования ЯСК КК используют концентрацию ДМСО и время эквилибрации с ним, установленные для прогениторных клеток костного мозга и периферической крови (Hunt C.J., 2003), которые зачастую разрабатывались эмпирически. Криоконсервирование по этим протоколам может приводить к потерям до 50% популяции ядросодержащих клеток КК, а учитывая ограниченный объем при заготовке, такие потери для кордовой крови неприемлемы.

В нашей работе мы использовали ДМСО в концентрации 2,5-15% и время инкубации 0-60 минут с целью изучения влияния концентрационного и временного фактора на суспензию ЯСК.

При исследовании влияния различных концентраций ДМСО и времени эквилибрации с ним на сохранность ЯСК, можно констатировать тот факт, что увеличение как концентрации криопротектора, особенно до 10 и 15%, так и времени экспозиции с ним (особенно после 30 мин), вызывает выраженное снижение количества клеток (табл.1).

Анализ жизнеспособности показал, что до 30 мин. происходит снижение данного параметра, а дальнейшее увеличение числа жизнеспособных клеток указывает лишь на относительность этого показателя, связанного с разрушением части клеток, идущих в анализ (на что указывают данные по сохранности).

Одним из проявлений токсичности криопротектора может быть накопления высоких концентраций АФК, которые способны привести к развитию апоптоза и гибели клеток, как до, так и после замораживания. Основными АФК являются пероксид водорода ($H_2O_2$), супероксид анион ($O_2^-$) и гидроксильный радикал ($OH^-$).

АФК важны для нормального функционирования клеток, т.к. являются важными промежуточными метаболитами в биологических системах, которые влияют на многочисленные клеточные процессы, включая метаболизм, дифференциацию, клеточную пролиферацию и апоптоз. Но они также способны вызывать патологические процессы путем необратимого окисления биологических молекул и изменения их свойств. Поэтому очень важно, чтобы присутствие АФК в клетках было сбалансировано. Исходя из этого определение их содержания может являться одним из ключевых интегральных параметров оценки состояния ЯСК на этапе эквилибрации с криопротектором (Thannickal V.J., 2000).

Таблица 1.

Сохранность и жизнеспособность ЯСК КК в зависимости от концентрации ДМСО и времени эквилибрации.

| Концентрация ДМСО, % | | Время эквилибрации, мин | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| 2,5 | А | 99,6±2,4 | 99,2±1,09 | 98,8±0,91 | 98,8±1,23 | 97,6±1,63 |
| | Б | 97,2±1,48 | 96,1±1,42 | 95,6±1,58 | 95,0±1,74 | 95,8±0,92 |
| 5 | А | 98,8±0,96 | 98,8±0,92 | 98,4±0,76 | 96,4±1,41 | 95,6±0,76 |
| | Б | 97,0±0,8 | 95,3±0,64 | 94,5±1,42 | 94,6±0,98 | 96,0±1,17 |
| 7,5 | А | 96,4±1,38 | 95,6±0,76 | 95,6±2,8 | 91,6±0,75 | 87,6±2,37 |
| | Б | 96,6±0,64 | 95,3±1,8 | 94,4±2,13 | 94,7±1,31 | 96,2±1,45 |
| 10 | А | 96,4±0,78 | 96,0±0,86 | 87,6±2,92 | 83,7±2,15 | 71,7±2,92 |
| | Б | 95,5±0,92 | 94,6±0,78 | 92,0±1,74 | 92,8±1,45 | 95,5±1,4 |
| 15 | А | 95,6±2,12 | 91,6±1,98 | 83,7±2,48 | 72,5±2,98 | 65,3±2,54 |
| | Б | 95,3±2,32 | 94,7±1,91 | 91,8±1.62 | 92,9±1,74 | 95,0±0,68 |

Примечание: А – сохранность (%); Б – жизнеспособность (%).

В данной работе внутриклеточное содержание АФК оценивали с использованием производного $H_2$DCFDA – вещества, которое проявляет флуоресцентные свойства при окислении внутри клетки.

Полученные данные по измерению накопления АФК показали, что с увеличением концентрации ДМСО и времени эквилибрации с ним происходит увеличение данного показателя (рис.1), что может указывать как на развитие окислительного стресса, так и на ингибирование антиоксидантной системы в клетке.

Для обеспечения максимальной защиты от окислительного стресса клетки имеют хорошо развитую антиоксидантную систему, которая содержит разные низко- и высокомолекулярные соединения, способные "перехватывать" свободные радикалы или нейтрализовать источник их возникновения. Одним из антиоксидантов является N-ацетил-L-цистеин (АЦ), который представляет собой модифицированную форму аминокислоты цистеина и вносит существенный вклад в глутатионовый каскад, способствуя синтезу глутатиона в клетке. Глутатион содержится внутри клеток и выполняет функцию донора водорода и кофактора ряда антиоксидантных ферментных систем, играет ключевую роль в защите клеток от негативного воздействия активных форм кислорода.

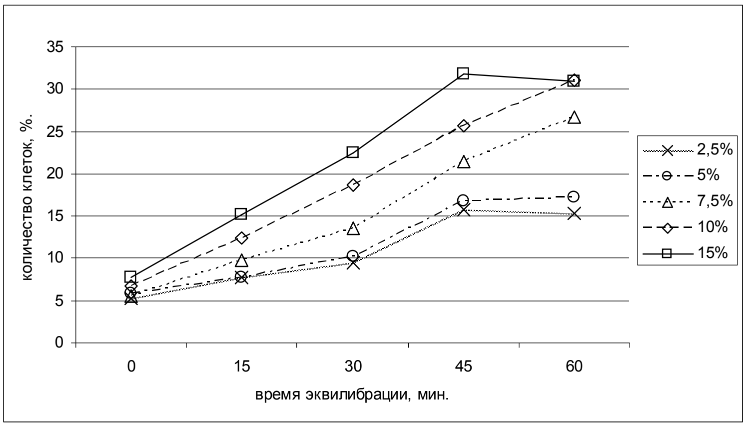



Рис. 1. Накопление АФК в ЯСК КК в зависимости от концентрации ДМСО и времени эквилибрации.

Поскольку в нашей работе было показано увеличение содержания АФК при эквилибрации ЯСК КК с ДМСО, что может быть связано с нарушением работы антиоксидантной системы, целесообразно было использовать антиоксидант. Ранее нами был проведен целый ряд экспериментов по использованию различных концентраций N-ацетил-L-цистеина: 2,5; 5; 10; 15 и 30 мМ.

При добавлении к суспензии клеток с различными концентрациями ДМСО 2,5 и 5 мМ раствора АЦ не было получено видимого эффекта, в то время как концентрация 30 мМ приводила к снижению сохранности и жизнеспособности клеток, не зависимо от концентрации криопротектора. При сравнении концентрации АЦ 10 и 15 мМ лучшие результаты были получены при использовании 15 мМ раствора антиоксиданта, поэтому для проведения дальнейшей серии экспериментов была использована данная концентрация АЦ (данные не представлены).

Благодаря своим антиоксидантным свойствам N-ацетил-L-цистеин, добавленный в среду с ДМСО, способствует снижению внутриклеточного содержания АФК в клетках (рис.2), а также увеличению сохранности и жизнеспособности (табл.2), что может свидетельствовать об активации антиоксидантных процессов в клетках, которые способствуют предотвращению развития окислительного стресса. Это может играть ключевую роль в ингибировании развития апоптоза и гибели клеток, как на этапе подготовки к криоконсервированию, так и после замораживания-отогрева.

Таблица 2.

Сохранность и жизнеспособность ЯСК КК при различном времени эквилибрации с ДМСО при добавлении N-ацетил-L-цистеина (%).

| Концентрация ДМСО% | | Время эквилибрации, мин | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| 2,5 | А | 99,6±1,27 | 99,6±0,92 | 99,6±1,32 | 99,4±1,4 | 98,8±0,96 |
| | Б | 97,3±1,23 | 96,1±0,74 | 95,8±1,21 | 95,2±0,92 | 95,2±0,74 |
| 5 | А | 99,6±0,8 | 99,4±0,63 | 99,4±1,72 | 98,8±1,28 | 98,0±1,87 |
| | Б | 97,3±0,5 | 95,9±1,28 | 95,5±0,64 | 95,2±0,64 | 94,5±2,41 |
| 7,5 | А | 98,8±2,4 | 98,6±1,38 | 98,4±0,82 | 98,0±0,8 | 97,0±1,78 |
| | Б | 97,0±0,87 | 95,5±0,98 | 94,8±0,76 | 94,5±0,76 | 94,6±1,38 |
| 10 | А | 98,4±1,21 | 98,0±0,87 | 96,8±2,3 | 95,6±1,87 | 92,9±1,19 |
| | Б | 96,5±063 | 95,8±1,89 | 93,3±1,8 | 92,8±2,1 | 93,7±1,03 |
| 15 | А | 97,2±1,12 | 96,4±0,76 | 96,0±0,76 | 93,7±1,27 | 87,6±2,24 |
| | Б | 95,6±0,72 | 95,1±0,64 | 93,2±0,78 | 93,0±0,76 | 93,0±1,97 |

Примечание: А – сохранность (%); Б – жизнеспособность (%).

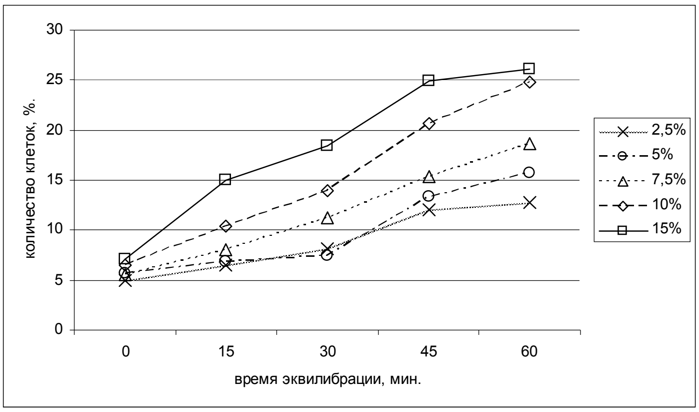



Рис. 2. Накопление АФК в ЯСК КК в зависимости от концентрации ДМСО и времени эквилибрации при добавлении N-ацетил-L-цистеина.

Таким образом, анализ накопления АФК в ЯСК КК показал, что с увеличением концентрации ДМСО и времени эквилибрации с ним происходит увеличение данного показателя. Это может указывать как на развитие окислительного стресса, так и на ингибирование антиоксидантной системы в клетках. Добавление в суспензию клеток N-ацетил-L-цистеина позволило снизить содержание АФК и, как следствие, улучшить показатели сохранности и жизнеспособности ЯСК КК на этапе обработки криопротектором. Полученные результаты могут стать предпосылкой к усовершенствованию существующих методов криоконсервирования ЯСК КК, за счет предотвращения развития апоптоза и, как следствие, гибели клеток.

**Литература**

1. Федорова Т.А, Аппалуп М.В. Использование пуповинной крови как альтернатива донорским трансфузиям в неонатологии // Кл. трансплант. и тканевая инж. 2006. Т.3, №1. С.39-41.

2. Chaudhari AA. Reactive oxygen species regulate Bax translocation and mitochondrial transmembrane potential, a possible mechanism for enhanced TRAIL-induced apoptosis // Oncol Rep. 2007. V. 18, №1.C.71-76.

3. Knuckey N.W. N-acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats Stroke // J. of cerebral circulation. 2005. V.26, № 2. P.305-310.

4. Basic Cell Culture. // Ed. by J.M. Davis Oxford: Oxford University Press. 2002. P. 382

5. Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry // Cytometry. 1992. Vol.13. P.204-208.

6. Hunt C.J., Armitage S.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of $CD34^+$ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology. 2003. V.46, № 1. P.76-87.

7. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2000. V.279. P.1005-1028.

## АДАПТИВНАЯ РОЛЬ ЦЕРЕБРОЗИДОВ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

**Балан И.В., Борончук Г.В., Рошка Н.В., Бузан В.И., Казакова Ю.М., Мереуца И.Г.**

*Институт физиологии и санокреатологии АНМ, Кишинев, Молдова*

E-mail: balanion@rambler.ru

**Введение.** Липиды играют важную, а иногда и предопределяющую роль в стабилизации функционального гомеостаза клеток. Лучше всего изучены компенсаторные явления в биологических мембранах, связанные с изменением температуры среды. Компенсаторные изменения в мембранах должны исключить, или хотя бы, ослабить те критические фазовые переходы в липидах, которые могли бы нарушить жидкокристаллическую структуру мембран, их барьерные свойства, проницаемость и др. (Крепс Е.Н., 1981). Вместе с тем, адаптационно-компенсаторный механизм липидов может обеспечить сохранение мембранами такого фазового состояния, которое позволило бы им нормально выполнять многообразные и жизненноважные функции, несмотря на изменение внешней среды. Исходя из изложенного, и учитывая тот факт, что плазматические мембраны играют основную роль в регуляции поступления вещества, энергии и информации в клетку и из нее и, что мембраны участвуют во всех процессах, обеспечивающих жизнедеятельность клетки, целью проведенных исследований было изучить криогенные изменения цереброзидов в процессе консервации семени различных видов сельскохозяйственных животных.

**Материал и методы исследования.** Предметом исследования служили плазматические мембраны гамет петухов породы род-айленд и хряков крупной белой породы, содержащихся в условиях соответствующих действующим ветеринарно-санитарным требованиям. Замораживание семени указанных видов животных проводили в форме гранул на поверхности фторопластовой пластины в парах жидкого азота при температуре -110°-120°С. Выделение богатых фракций плазматических мембран гамет проводили по методике Ivanov N., Profirov I. в нашей модификации (Наук В.А., Борончук Г.В., 1993) с использованием двухфазной полимерной системы, состоящей из декстрана с молекулярной массой 500000 D и полиэтиленгликоля-6000 D. Содержание цереброзидов определяли по сиаловой кислоте (Мэдди Э., 1981). Статистическую обработку цифрового материала проводили с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Цереброзиды относятся к гликолипидам и встречаются в различных тканях животного и растительного происхождения. В силу их специфической структуры и малой изученности особый интерес представляет влияние низких температур на их участие в поддержании функционального состояния биологических мембран. Анализ денситограмм показывает, что выделенные нами цереброзиды нативных и оттаянных мембран гамет петуха представлены шестью фракциями (табл. 1).

Среди цереброзидов превалирует содержание первой и третьей фракций, составляющих больше половины их общего количества. Процесс замораживания и оттаивания семени петуха вызывает изменения количественного содержания цереброзидных фракций. Наиболее ярко выражены эти изменения в фракции 3. Следует отметить, что содержание фракции 3 в результате консервации возрастает и составляет 190% от нативных мембран. В то же время, содержание других фракций снижается и особенно выражено это в фракции 5, где содержание цереброзидов после оттаивания снижается на 50%. Исключение составляют цереброзиды фракции 7, где их содержание практически не меняется в процессе технологической обработки семени.

Таблица 1.

Криогенные изменения цереброзидного спектра плазматических мембран гамет петуха

| Фракции цереброзидов | Содержание цереброзидов (%) в: | |
|---|---|---|
| | нативных мембранах | замороженно-оттаянных мембранах |
| | M ± m | M ± m |
| Цереброзид-1 | 31,27 ± 0,740 | 28,80 ± 0,099* |
| Цереброзид-3 | 19,74 ± 0,510 | 37,48 ± 0,842* |
| Цереброзид-5 | 13,87 ± 0,430 | 6,92 ± 0,092* |
| Цереброзид-6 | 15,00 ± 0,170 | 11,27 ± 0,317* |
| Цереброзид-7 | 7,82 ± 0,198 | 7,71 ± 0,280 |
| Цереброзид-8 | 12,28 ± 0,357 | 7,81 ± 0,190* |

*Статистически достоверны криогенные изменения.

Экспериментальные исследования с применением плазматических мембран хряка позволили выделить 8 цереброзидных фракций (табл. 2).

Таблица 2.

Эффективность стабилизации цереброзидного спектра плазматических мембран с использованием синтетических сред при криоконсервации семени хряка

| Фракции цереброзидов | Содержание цереброзидов (%) в: | |
|---|---|---|
| | нативных мембранах | замороженно-оттаянных мембранах |
| | M ± m | M ± m |
| Цереброзид-1 | 28,39 ± 0.371 | 11,73 ± 0,096* |
| Цереброзид-2 | 14,14 ± 0,024 | 3,67 ± 0,150* |
| Цереброзид-3 | 14,93 ± 0,150 | 13,27 ± 0,234* |
| Цереброзид-4 | 15,07 ± 0,078 | 21,70 ± 0,356* |
| Цереброзид-5 | 6,21 ± 0,064 | следы |
| Цереброзид-6 | 7,01 ± 0,051 | 16,79 ± 0,130* |
| Цереброзид-7 | 4,46 ± 0,201 | 8,12 ± 0,160* |
| Цереброзид-8 | 9,77 ± 0,249 | 24,63 ± 0,250* |

*Статистически достоверны криогенные изменения.

Среди них превалирует содержание фракции 1. В результате завершения цикла замораживания-оттаивания имеют место как количественные, так и качественные изменения цереброзидов плазматических мембран. Наиболее выражены эти изменения в 1, 2, 6 и 8 фракциях. Необходимо подчеркнуть, что содержание фракций 6, 7 и 8 под влиянием факторов криоконсервации возрастает. В противоположность этому, содержание 1 и 2 фракций снижается. Выявленные различия в структуре цереброзидных изменений, очевидно, носят закономерный характер и определяют устойчивость гамет к действию факторов замораживания и оттаивания. Резюмируя результаты исследований можно отметить, что в липидном спектре, характерном для плазматических мембран гамет хряка и петуха, отмечаются существенные как видовые, так и криогенные изменения.

Наблюдаемые изменения содержания цереброзидов плазматических мембран гамет петуха и хряка в процессе криоконсервации свидетельствуют о развитии сложных адаптационно-компенсаторных реакций, которые направлены на сохранение жизнеспособности гамет в новых условиях их хранения (Борончук Г.В., Балан И.В., 2008).

Плазматические мембраны выполняя важные функции, не только отделяют содержание клетки от окружающей среды, но и способствуют протеканию специфических реакций в гидрофобной среде мембран. Даже белки, образующие в мембране ассоцианты, приобретают зависимость от липидного окружения, что способствует повышению адаптационных возможностей биологических объектов. Состояние мембранного бислоя существенно зависит от состава и соотношения образующих его липидов. Вместе с тем, установлено что в зависимости от окружающей среды имеет место изменение количества двойных связей в жирнокислотных цепях мембранных липидов. В результате этого бислой разрыхляется, что препятствует увеличению вязкости мембран при низкой температуре. Такие изменения жирнокислотного состава мембранных липидов создает благоприятные условия для реализации адаптивных реакций (Болдырев А.А., 2001). Адаптивная роль липидов касается не только тех, которые составляют матрицу биологических мембран, но и многих липидов, не входящих в мембранные структуры.

Гаметы не справились бы с проблемой компенсации мембранных процессов, необходимых для поддержания функциональной активности, если не существовал бы универсальный биохимический механизм, основанный на адаптивной способности липидов (Хочачка Р. и др., 1977).

Обобщение результатов, представленных в таблице 1 и 2 позволяет заключить, что цереброзиды плазматических мембран гамет хряка и петуха в процессе криоконсервации подвергаются компенсаторным изменениям. Стабилизация содержания их в оптимальных интервалах возможна путем совершенствования состава криозащитных сред. При этом, в чем бы ни состояло повреждение на молекулярном уровне, изменения, происходящие при критической температуре, обычно приводили бы к гибели криоконсервируемых объектов, если бы не реализовывался компенсаторный механизм через адаптивную функцию липидов.

**Выводы**

1. Цереброзидный спектр плазматических мембран гамет хряка отличается от такового у петуха.

2. Изменение содержания цереброзидов свидетельствует о структурных перестройках плазматических мембран на технологических этапах криоконсервации.

3. Различные фракции цереброзидов по разному реагируют на действие экстремальных факторов.

4. В то время как содержание одних фракций цереброзидов уменьшаются – других увеличивается, что свидетельствует о адаптационно-компенсаторных реакциях, протекающих в плазматических мембранах гамет хряка и петуха в процессе их низкотемпературной консервации.

**Литература**

1. Болдырев А.А. Матриксная функция биологических мембран. Соросовский образовательный журнал, 2001, том 7, № 7, с. 2-8.

2. Борончук Г.В., Балан И.В. Структурно-функциональные и биохимические изменения в биологических системах при криоконсервации. Chisinau: Tipografia ASM, 2008. 633 с.

3. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Ленинград: Наука, 1981. 340 с.

4. Мэдди Э. Биохимическое исследование мембран. М.: Мир, 1979. 400с.

5. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. Кишинев: Штиинца, 1991. 200 с.

6. Хочачка Р., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 379с.

## ПРИМЕНЕНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОРДОВОЙ КРОВИ В ЛЕЧЕНИИ РЕТИНОПАТИИ С НЕОАНГИОГЕНЕЗОМ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Белецкая П.В., Дёмин Ю.А., Гапунин И.Д.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины*

**Актуальность.** Криоконсервирование – единственный способ долгосрочного хранения клеток и тканей. На современном этапе заместительная клеточная терапия является альтернативным методом лечения заболеваний, характеризующихся необратимым повреждением тканей, в том числе, сопровождающихся процессом неоангиогенеза.

Успешные результаты и широкие перспективы применения криоконсервированных стволовых клеток в различных областях медицины пробуждают интерес к их использованию в офтальмологии.

Все заболевания органа зрения, проходящие в своем патогенезе фазу неоваскуляризации, ведут к необратимому снижению зрения и слепоте. К ним относятся диабетическая ретинопатия, влажная форма возрастной макулярной дегенерации, ретинопатия недоношенных, а также неоваскуляризация вследствие окклюзий центральных сосудов сетчатки. В развитии неоваскулярной ретинопатии критическую роль играет гипоксия, которая индуцирует гибель ганглионарных клеток сетчатки и других нейронов, приводя к необратимому снижению зрения.

Несмотря на значительные успехи традиционного лечения, профилактики прогрессирования и развития осложнений при патологии сетчатки и зрительного нерва (Chakravarthy U., Evans J., Rosenfeld P.J.,2010), на данном этапе не удалось восстановить утраченные зрительные функции.

Главным фактором стимуляции роста новообразованных сосудов является сосудистый эндотелиальный ростовой фактор (VEGF), а его потенциальный ингибитор – фактор роста пигментного эпителия (PEDF). Эти про-и антиангиогенные факторы экспрессируются в сетчатой оболочке глаза.

Стволовые клетки обладают высоким пролиферативным потенциалом и выраженной способностью к самовоспроизводству, что необходимо для поддержания гомеостаза ткани, к которой они принадлежат. Полученные на сегодня данные свидетельствуют о положительном влиянии применения стволовых клеток на процессы репаративной регенерации в поврежденной ткани.

Стволовые клетки кордовой крови (СК КК) экспрессируют те же маркеры, что и ЭСК, а также могут дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков: мезодермы (эндотелиоподобные клетки), эктодермы (нейроподобные клетки) и эндодермы (инсулин продуцирующие клетки). СК КК менее требовательны к условиям для деления по сравнению с эмбриональными клетками. Однако нужно отметить, что потенциал к долговременной пролиферации СК КК существенно снижается при длительном культивировании (Y. Zhao, H. Wang, Th. Mazzone, 2006).

Кроме того, с технической точки зрения, получение СК КК существенно проще, чем ЭСК. Таким образом, клетки кордовой крови являются наиболее подходящим источником стволовых клеток.

**Цель работы.** Изучение действия клеток ККК для оптимизации лечение ретинопатий с неоангиогенезом.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на 30 крысах линии Wistar. Животные были разделены на три группы: 1 (основная) крысы с неоваскулярной патологией сетчатки, которым было введено интравитреально препарат криоконсервированной кордовой крови – 10 животных (20 глаз); 2 (контрольная) крысы с неоваскулярной патологией сетчатки, не получавшие лечение – 10 животных (20 глаз); 3 (интактная) нормальные животные – 10 животных (20 глаз).

Для экспериментального лечения использовали препарат ядросодержащих клеток пуповинной крови (ЯДК ПК), который вводился животным из основной группы интравитреально на 13 день постнатального развития в дозе 0,0125 мл (100 000 клеток).

Для забора глаз на морфологическое и иммунологическое исследования животных выводили из эксперимента на 13 и 44 сутки методом воздушной эмболии на фоне глубокого наркоза путем внутримышечного введения 5% раствора тиопентала натрия. Работа с животными велась согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986) и постановления IV Национального конгресса по биоэтике (Киев, 2010).

Для изучения структуры изменений в сетчатке было проведено патоморфологическое исследование заднего сегмента глаза животным из трех групп. Проведена энуклеация и фиксация материала в 10% растворе формалина для дальнейшего гистологического исследования сетчатки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Для определения уровня экспрессии генов VEGF и PEDF в образцах сетчатки глаз крыс проводилась ПЦР в реальном времени (RT-PCR) согласно следующим параметрам. После препарирования фрагментов ткани сетчатки ее помещали в консервирующий раствор RNA later (Lifetechnologies, США) для предупреждения разрушения мРНК. Перед выделением тотальной мРНК ткань изымали из раствора RNA later и промывали в фосфатно-солевом буфере.

Тотальную мРНК из образцов ткани выделяли при помощи AccuZol™ реагента (BioNeer, США) согласно протоколу производителя. С целью избавления от остатков геномной ДНК выделенные мРНК (1 мкг на реакцию) подлежали обработке DNase I (ThermoScientific, США) также согласно протоколу производителя кДНК получали путем обратной транскрипции образцов мРНК с использованием Revert AidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific).

RT-PCR анализ проводили с исползованием полученных кДНК, специфических праймеров. ПЦР-амплификацию (=100 нгкДНК на реакцию) проводили при таких условиях: первый цикл – $95^0$C/10 мин;35 циклов - $95^0$C/ 20 сек, $61^0$C/30 сек, $72^0$C/30 сек. Для получения относительных уровней экспрессии генов VEGF и PEDF проводили биоинформатический анализ полученных данных с использованием сравнительного ΔCT метода, где уровень экспрессии гена (X) = 2^-ΔCT, ($\Delta CT = (CT_{\textit{ген интереса}} - CT_{\textit{контрольный ген}})$, или метода сравнения ΔΔCT, где уровень экспрессии гена (X) = 2^-ΔΔCT, ($\Delta\Delta CT = ((CT_{\textit{ген интереса}} - CT_{\textit{контрольный ген}})_{\text{группа НОРМА}} - (CT_{\textit{ген интереса}} - CT_{\textit{контрольный ген}})_{\text{группа ПАТОЛОГИЯ}})$.

**Результаты и обсуждение.** У животных интактной группы на 13 и 44 сутки контроля были иммунологически выявлены низкие уровни экспрессии генов VEGF (0,07 и 0,062) и PEDF (0,07 и 0, 065). Соотношение VEGF/ PEDF было близко к 1,0, а значит процессы неоангиогенеза и его ингибирования находились в состоянии равновесия. Морфологически сетчатка у животных этой группы также была интактной, все ее слои четко дифференцировались, толщина соответствовала нормальным показателям. В группе патологии на 13 день контроля иммунологически обнаружено резкое повышение экспрессии гена проангиогенного фактора в 46 раз и составил 2,87. В этот же срок контроля уровень антиангиогенного фактора составил 0,099, что на 52% превысило исходный уровень. Соотношение VEGF/ PEDF составило 28, 3, что говорит о преобладании процесса неоангиогенеза. Морфологически выявлено утолщение сетчатой оболочки за счет отека, преимущественно внутреннего ядерного слоя. Также обнаружены узлы неоваскуляризации в центральной и периферической зоне сетчатой оболочки, нарушающие структуру внутренней пограничной мембраны. На 44 сутки выявлено снижение в динамике экспрессии гена VEGF на 33% (его значение составило 1,93), и повышение PEDF на 1631,7% (1,16). VEGF/ PEDF составило 1,67. Морфологически выявлено прогрессирование ретинопатии с неоангиогенезом, истончение слоев сетчатой оболочки, формирование эпиретинальной мембраны, формирование тракционных сращений. Отмечено, что узлы неоваскуляризации распространились на заднюю гиалоидную мембрану, в толщу стекловидного тела, заднюю капсулу хрусталика. Можно сказать, что даже небольшое (в 1,67 раза) преобладание уровня проангиогенного фактора над антиангиогенным позволяет новообразованным сосудам распространяться по сетчатой оболочке, усугубляя течение ретинопатии. В основной группе животных на 44 сутки исследования иммунологически выявлено снижение уровня экспрессии гена VEGF на 854% и 1307% по сравнению с патологией на 44 и 13 день соответственно, его среднее значение составило 0,19. Также выявлено увеличение экспрессии гена PEDF по сравнению с нормой на 2571%, с патологией на 13 и 44 сутки наблюдения соответственно на 1788% и 60%. Во всех исследованных пробах у крыс, получавших лечение препаратом ЯДК ПК, выявлено значительное преобладание PEDF над VEGF – 839%. По результатам патоморфологического исследования срезов глазных яблок в основной группе выявлены конгломераты запустевших новообразованных сосудов. Внутренняя пограничная мембрана была интактной, тракционных сращений не было обнаружено. Кроме того, увеличилась толщина сетчатой оболочки по сравнению с группой патологии на 9 %. По нашему мнению этим процессам способствует интеграция введенных стволовых клеток в составе препарата кордовой крови. Заметим, что увеличение толщины сетчатки произошло в большей степени за счет внутреннего ядерного слоя, где происходит секреция и выделение клетками Мюллера PEDF и других антиангиогенных факторов. Кроме того, ВЯС играет важную роль в нормализации и регуляции метаболизма сетчатки (Вит В.В.).

В данной работе мы не выяснили, произошла ли дифференцировка введенных СК из препарата ЯДК ПК. Однако изменение соотношений про- и антиангиогенных факторов, нормализация архитектоники сетчатой оболочки у крыс 1 группы свидетельствует в пользу функциональной активности введенного клеточного материала.

По всей видимости, терапевтический эффект клеток кордовой крови основан на сохранении после отогрева жизнеспособности и функциональной активности СК, а также выработке биологически активных веществ. Одним из основных механизмов действия ККК является нейротрофическое влияние, модуляция и коррекция процессов неоангиогенеза и его ингибирования. Все это позволяет активно влиять на сохранение постоянства внутренней среды и баланс про- и антиангиогенных факторов.

В заключение важно отметить, что неоваскулярная ретинопатия возникает у пациентов разного возраста, затрагивая и период новорожденности, и зрелый возраст и пожилой. Традиционных методов лечения недостаточно для полноценного процесса репарации сетчатой оболочки. Применение клеток криоконсервированной кордовой крови позволяет нормализовать морфологическую структуру сетчатки, восстановить баланс между факторами активаторами и ингибиторами ангиогенеза.

Таким образом, препарат ЯДК ПК должен быть использован в лечении ретинопатии с неоангиогенезом. Это позволит стабилизировать и предотвратить прогрессирование патологического процесса.

**Литература**

1. Chakravarthy U., Evans J., Rosenfeld P.J. Age related macular degeneration/ U.Chakravarthy, J. Evans, P.J. Rosenfeld// B.M.J. 2010.№ 340. P.981.

2. Zhao Y., Wang H., Mazzone Th. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics/ Y. Zhao, H. Wang, Th. Mazzone// Experimental Cell Research. 2006. №312. P.2454 – 2464.

3. Вит В.В. Строение зрительной системы человека/ Вит В.В. Одесса, 2003. С. 285-286.

## СОСТОЯНИЕ ВОДЫ В ЭКСТРАКТАХ И СУСПЕНЗИЯХ КЛЕТОК С ЭКСТРАКТАМИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПЛАЦЕНТЫ

**Боброва Е.Н., Щетинский М.И., Зинченко А.В., Розанова Е.Д.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: helen.bobrova.77@gmail.ru, alexazin@mail.ru

Наличие биологически активных веществ в экстрактах плаценты обуславливает их иммунорегулирующее, регенеративное, нейропротекторное, противовоспалительное, обезболивающее и противоаллергическее действие (Грищенко В.І., 2004; Sur T.K., 2003). Благодаря этому экстракты плаценты находят активное применение в лечебной практике и косметологии (Грищенко Н.Г., 2011; Chakraborty P.D., 2009; Shinde V., 2006). С целью длительного сохранения этих уникальных свойств экстрактов разрабатываются технологии низкотемпературного консервирования плаценты. Экстракты, приготовленные из замороженной плаценты, содержат значительное количество белков с молекулярной массой в диапазоне 10-20 кДа (Розанова С.Л., 2010; Nardid O.A., 2012). Именно в этой части спектра содержится основное количество полипептидных ростовых факторов, белков “зоны беременности”, а также гормонов белкового происхождения. Таким образом, экстрактам, приготовленным из замороженной плаценты, присущи новые функциональные свойства, которые могут сказаться при взаимодействии их с клетками.

Способность живых систем переносить низкие температуры тесно связана с особенностями фазовых переходов воды в них при температурах ниже 0$^{o}$C (Зинченко А.В., 2004). С другой стороны сведения о фазовом состоянии биологических объектов и количестве подвижной воды в них при температурах ниже 0°C представляют интерес для криобиологии. Данный показатель может характеризовать возможность протекания химических и биохимических реакций в жидких микрофазах замороженного материала.

**Целью исследования** явилось исследование состояния воды в экстрактах, приготовленных из плаценты, как до, так и после хранения её при температурах -20°С и -196°С, и влияния экстрактов на состояние воды в суспензиях эритроцитов и дрожжеподобных грибов *Candida Albicans*.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования были водно-солевые экстракты плаценты человека (ЭПЧ), суспензии эритроцитов и дрожжеподобных грибов *Candida Albicans*.

ЭПЧ получали стандартным методом (Розанова С.Л., 2010) из плаценты, которая прошла тестирование на наличие вирусных инфекций и хранилась не больше 24 часов при 4°С, на протяжении 6 месяцев при -20°С и -196°С.

Кровь на консерванте „Глюгицир” получали от здоровых доноров на Харьковской областной станции переливания крови. Клетки *C.albicans* выращивали при 37°С в течение 48 часов на агаризованной среде Сабуро. Эритроциты и клетки *C.albicans* трижды отмывали 155мМ Na - фосфатным солевым буфером pH 7,4 с центрифугированием в течение 5 мин. при 800 g. Все клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин. при 800 g и смешивали с экстрактом плаценты в соотношении 1:1. Для определения влияния низкотемпературного хранения плаценты на количество связанной воды в эритроцитах и *C.albicans*, экстракты инкубировали с эритроцитами донорской крови человека и дрожжеподобными грибами в течении 1 часа и 1 суток, после чего центрифугировали 15 минут при 800 g, потом убирали надосадок, а осадок использовали для дальнейших низкотемпературных исследований.

Метод ядерного магнитного резонанса на протонах ($^1$Н-ЯМР) использовали для исследования влияния водно-солевых ЭПЧ на процесс вращательной и трансляционной подвижности молекул воды (Kuntz I.D., 1969) в зависимости от времени инкубации с эритроцитами донорской крови и дрожжеподобными грибами *C.albicans*, а также количества невымороженной воды, остающейся связанной. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Tesla BS 567A с рабочей частотой 100 Мгц для протонов. Как эталон использовали тетраметилсилан (ТМС) в запаянном стеклянном капилляре, который помещали в ампулу с исследованным образцом. Количество исследуемого образца составляло 1 мл. Температуру поддерживали с точностью $\pm$0,5°С с помощью стандартной термоприставки.

Исследования фазовых переходов в области температур 0÷-196°С проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном в ИПК и К НАН Украины (Зинченко А.В., 1983). Образцы охлаждали путем погружения в жидкий азот со средней скоростью охлаждения 3,3(3)°С/с. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью $8,3(3) \cdot 10^{-3}$ °С/с. Погрешность измерения температуры составляла ± 0,2 °С.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Исследования температурной зависимости интегральной интенсивности сигнала $^1$H-ЯМР воды осадка суспензии эритроцитов показали, что количество её не изменялось при снижении температуры до -18°С±2°С. Ниже этой температуры происходило резкое уменьшение сигнала $^1$H-ЯМР, поскольку с появлением кристаллов льда ширина его сигнала поглощения на несколько порядков превышала ширину сигналов $^1$H-ЯМР фракции подвижной воды, поэтому и не регистрировалась в спектре ЯМР высокой разрешающей способности. Эти результаты несколько отличались от температурной зависимости количества подвижной воды в дрожжеподобных грибах, где температура кристаллизации составляла -23°С±2°С, что может объясняться разным количеством белков и нуклеотидов в объектах исследования с соответствующим переохлаждением систем.

При температурах ниже кристаллизации основной массы растворителя в спектрах $^1$H-ЯМР остаются сигналы только тех молекул воды, которые имеют значительную трансляционную и вращательную подвижность. Это может быть вода связанная как с гидрофильными центрами макромолекул исследуемых систем, так и вода, входящая в состав незамерзающих включений солевого раствора.

Для определения количества связанной воды снижение температуры образца осуществляли до -50°С. При этой температуре количество связанной воды в осадке суспензии эритроцитов составляло 6,5±0,5%, а дрожжеподобных грибов - 11±1% относительно всей воды в системе (Таблица). Количество связанной воды в ЭПЧ составляло 0,4±0,3, ЭПЧ из плаценты, хранившейся при -20°С - 0,5±0,3%, ЭПЧ из плаценты, хранившейся при -196°С - 0,45±0,15% относительно всей воды в системе (табл.).

Как показали результаты исследований, после 1 часа экспозиции эритроцитов с ЭПЧ из плаценты, хранившейся в течение 6 месяцев при -20°С и -196°С, количество связанной воды возрастало до 14±1% и 14,5±0,15% (табл.), соответственно, в то время, как у эритроцитов, инкубированных с водно-солевыми ЭПЧ из свежей плаценты этот показатель существенно не изменялся. Это может объясняться тем, что низкотемпературное хранение плаценты приводит к увеличению в низкомолекулярной фракции экстрактов количества белков и нуклеотидов, обладающих свойством проникать через мембрану эритроцитов и дополнительно связывать воду. Увеличение времени экспозиции с водно-солевыми ЭПЧ из плаценты, хранившейся в течение 6 месяцев при -20°С приводит к увеличению количества связанной воды в суспензии эритроцитов почти в 2 раза (27±1%), в то время, как после инкубации с ЭПЧ из свежей плаценты и хранившейся в течение 6 месяцев при -196°С её количество увеличивалось лишь на несколько процентов.

Таблица.

Количество связанной воды по данным $^{1}$Н-ЯМР – спектроскопии в суспензии эритроцитов и *C.albicans* в зависимости от времени инкубации с экстрактами плаценты человека, свежеполученной, хранившейся при -20°С и при -196°С в течение 6 месяцев (n=5)

| Плацента | Объект | Количество связанной воды, % относительно всей воды в системе | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Время инкубации | | Без инкубации |
| | | 1 час | 1 сутки | |
| Свежеполученная | экстракт | 0,4±0,3 | 0,4±0,3 | – |
| | эритроциты | 7±1 | 8,5±0,5 | 6,5±0,5 |
| | *Candida albicans* | 11±1 | 11±1 | 11±1 |
| Хранившаяся при -20°С | экстракт | 0,5±0,3 | 0,5±0,3 | – |
| | эритроциты | 14±1 | 27±1 | 8,5±0,5 |
| | *Candida albicans* | 11,5±0,5 | 11,5±0,5 | 11,5±0,5 |
| Хранившаяся при -196°С | экстракт | 0,45±0,15 | 0,45±0,15 | – |
| | эритроциты | 14,5±0,15 | 16±3 | 5±1 |
| | *Candida albicans* | 11±1 | 11±1 | 11±1 |

Результаты наших предыдущих исследований (Щетинский М.И., 1992) корреляции количества сильно связанной воды с большей криорезистентностью клеток, позволяют рекомендовать для увеличения криостойкости эритроцитов перед криоконсервированием обрабатывать их ЭПЧ из плаценты, хранившейся при -20°С или при –196°С. Однако при инкубации с ЭПЧ из плаценты, хранившейся при –196°С достаточно 1 ч, а хранившейся при - 20°С время инкубации можно увеличить.

В отличии от суспензии эритроцитов, как 1 час, так 1 сутки инкубации с ЭПЧ из плаценты, хранившейся в течение 6 месяцев при -20°С и при–196°С, не изменяли количества связанной воды у дрожжеподобных грибов *C.albicans* и составляли 11±1%, что совпадает с результатами исследований, полученных с *C.albicans*, инкубированной с ЭПЧ из свежеполученной плаценты. Этот факт можно объяснить особенностями строения клеток. Как известно, клеточная стенка дрожжей состоит из двух основных слоёв: внешнего – маннанового и внутреннего – глюканового. При этом с одной точки зрения (Белов А.П., 1986) - клеточная стенка дрожжеподобных грибов

*C.albicans* представляет собой систему жесткого маннанового слоя, комбинированного с эластичной глюкановой сеткой, которая находится в упругом состоянии. С другой - микрофибрилы глюкана представляют собой прочный ригидный скелет, встроенный в аморфный маннановый матрикс (Феофилова Е.П., 1983). С обеих точек зрения именно такое двухслойное строение стенки обеспечивает прочность, определяющая постоянную форму в самых разных экстремальных условиях, в том числе и при снижении температуры, обеспечивая высокую криорезистентность и не давая возможности проникнуть во внутриклеточную среду биоактивным веществам, даже их низкомолекулярным фракциям, которых после низкотемпературного хранения плаценты становится больше.

Исследования фазовых переходов в ЭПЧ, приготовленной из свежеполученной плаценты показали, что на этапе нагрева после охлаждения до температуры кипения жидкого азота на ДСК - термограмме регистрируется размытый экзотермический пик 1 (рис. 1), соответствующий завершению кристаллизации на этапе нагрева (Зинченко А.В., 1983). Этот экзотермический эффект регистрируется также в клеточных суспензиях, и в смесях клеток с ЭПЧ. На термограмме ДСК экстракта наблюдается также острый пик плавления эвтектических составов (пик 2), что свидетельствует о том, что при охлаждении образца произошла кристаллизация эвтектических составов. Это явление не наблюдается в смесях суспензий эритроцитов, *C.albicans* и ЭПЧ, что может быть обусловлено образованием комплексов солей с органическими соединениями (Шахпаронов М.И., 1980; Габуда С.П., 1982).

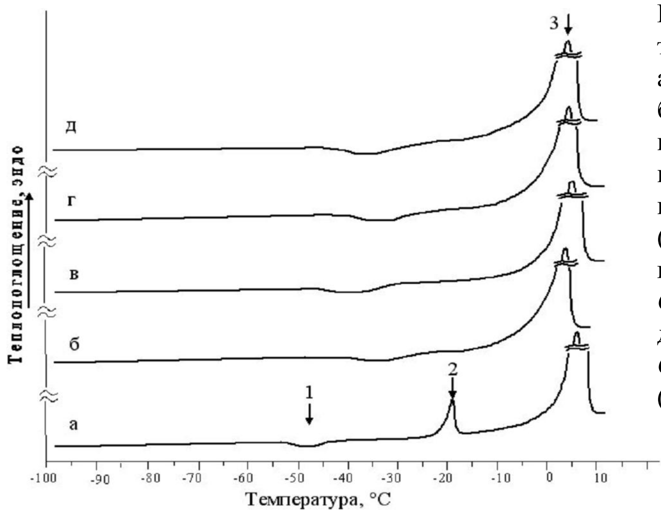



Рис. 1. ДСК термограммы:
а – ЭПЧ;
б - эритроцитарная масса;
в - эритроцитарная масса + ЭПЧ (1:1);
г – суспензия *C.albicans*;
д – суспензия *C.albicans* + ЭПЧ (1:1).

При определенной температуре во всех образцах начинается плавление закристаллизованной смеси (пик теплопоглощения 3).

На термограмме экстракта из плаценты человека, хранившейся при температуре -20°С (рис. 2 а) регистрируется экзотермический пик 4, соответствующий, вероятно, инверсии молекул (Потапов В.М., 1988). Это явление не наблюдается на термограмме ЭПЧ из свежей плаценты, что может свидетельствовать об изменении состава экстракта и межмолекулярных взаимодействий в нем. Острый эндотермический пик 2 соответствует плавлению эвтектических составов. Образование эвтектических составов обусловлено присутствием в исследуемых образцах солей. Основной вклад в кристаллизацию эвтектических составов вносит NaCl, о чем свидетельствует характерная температура плавления -21,3°С. Большая интенсивность пика плавления эвтектических составов на термограмме ЭПЧ из плаценты, хранившейся при -20°С по сравнению с термограммой ЭПЧ из свежей плаценты свидетельствует о том, что при её охлаждении образовалось большее количество кристаллов эвтектического состава. При инкубации суспензии эритроцитов и клеток *C.albicans* с ЭПЧ, приготовленным из плаценты, хранившейся при -20°С на термограммах ДСК регистрируется размытый экзотермический пик 1 завершения кристаллизации на этапе нагрева. Этот факт свидетельствует о том, что кристаллизация льда не успела завершиться на этапе охлаждения суспензий, что связано с высокими скоростями охлаждения, использованными в работе.

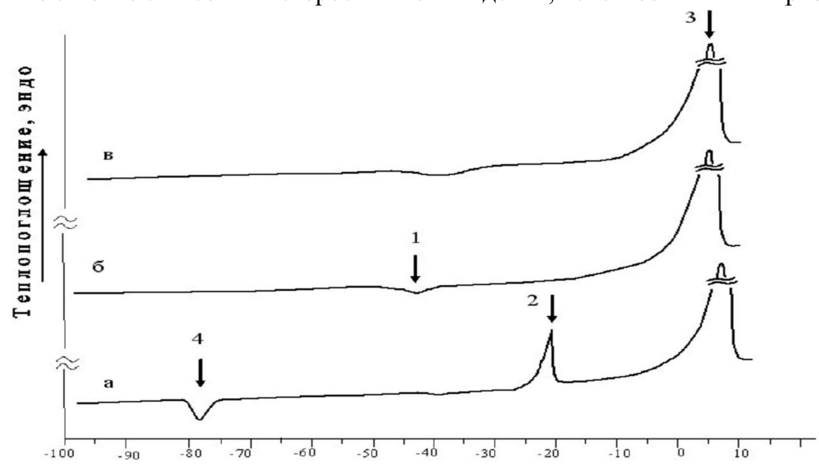



Рис. 2. ДСК термограммы: а – экстракт из плаценты, хранившейся при -20°С; б – эр.масса + экстракт из плаценты, хранившейся при -20°С (1:1); в - *C.albicans* + экстракт из плаценты, хранившейся при -20°С (1:1).

Как видно на рис. 3 хранение плаценты при температуре -196°С не повлияло существенно на характер фазовых переходов на ДСК термограмме экстракта, сделанного из нее. Также на термограммах смеси эритроцитов и *C.albicans* с ЭПЧ, полученной после предварительного хранения плаценты в жидком азоте не зарегистрировано изменений фазового поведения образцов.

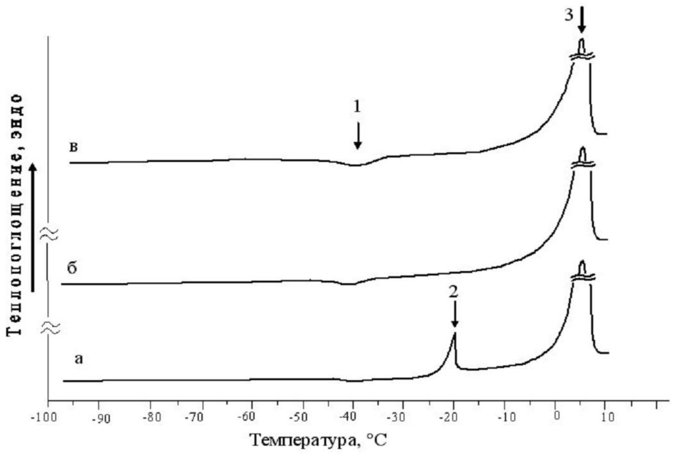



Рис. 3. ДСК термограммы: а – экстракт из плаценты, хранившейся при -196°С; б – эр.масса + экстракт из плаценты, хранившейся при -196°С (1:1); в - *C.albicans* + экстракт из плаценты, хранившейся при -196°С (1:1).

**Выводы.**

1. Низкотемпературное хранение плаценты в течение 6 месяцев приводит к увеличению количества связанной воды в суспензии эритроцитов, которые инкубировались с экстрактами на её основе.

2. Увеличение времени инкубации эритроцитов с ЭПЧ из плаценты, хранившейся при -20°С до одних суток приводит к увеличению количества связанной воды почти в 2 раза, в то время как инкубация дрожжеподобных грибов Candida albicans с ЭПЧ не влияет на количество связанной воды, что может объясняться особенностями строения их клеточной стенки.

3. Кристаллизация эвтектических составов экстракта плаценты с клеточными суспензиями не развивается в отличие от самих экстрактов. Это явление может объясняться образованием комплексов органических соединений с солями, ранее участвующими в образовании эвтектических составов.

4. Хранение плаценты при -20°С приводит к изменениям в характере фазовых переходов её экстрактов. На ДСК термограмме экстракта плаценты,

хранившейся при -20°С наблюдается увеличение интенсивности плавления эвтектических составов и регистрируется появление экзотермического эффекта, который отображает, вероятно, инверсию молекул.

**Литература**


1. Kuntz I.D., et al. Hydration of macromolecules // Science.1969. 163, № 3873. P. 1329-1331.
2. Nardid O.A., Pogozhykh D.N., Repina S.V., Rozanova S.L., Naumenko Ie.I., Rozanova E.D. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta extracts // J. Exp Integr Med. 2012.2(3). P.213-217.
3. Piyali Datta Chakraborty, Debashree De, Subhashree Bandyopadhyay and Debasish Bhattacharyya Human aqueous placental extract as a wound healer // J. Wound Care. 2009. Vol. 18. P. 462–467.
4. Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et. al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract // Pharmacologyonline. 2006. Vol. 3. P.172-179.
5. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L., Mukherjee D. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // Acta Pharmacol. Sin. 2003.Vol.24, № 2. P. 187-192.
6. Белов А.П., Каменев А.С. Роль компонентов клеточной стенки дрожжей рода Candida в морфологии клетки // Микробиология. 1986. Т. 55, вып. 3. С. 473-476.
7. Габуда С.П. Связанная вода. Факты и гипотезы. Новосибирск: Наука. 1982. 159 с.
8. Грищенко В.І., Шепітько В.І., Строна В.І. та інш. Зміна активності дегідрогеназ, вмісту гормонів і стану ліпопероксидації в алогенній плаценті в залежності від дії низьких температур // Проблемы криобиологии. 2004. № 1. С. 62-69.
9. Грищенко Н.Г., Геродес А.Г., Перлыгин И.В. Влияние терапии препаратами экстракта плаценты на динамику показателей клеточного звена иммунитета в периферической крови и фолликулярной жидкости пациенток с трубно - перитониальным бесплодием // Международный медицинский журнал. 2011. № 1. С.84-89
10. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур -150°С ч 0°С: автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. физ.-мат. наук.: спец. 01.04.15 - молекулярная физика. К., 1983. 20 с.

11. Зинченко А.В., Боброва Е.Н., Коваленко Г.В. Криомикроскопические исследования замораживания – оттаивания суспензий эритроцитов кордовой крови в присутствии глицерина, 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида // Міжвідомчий збірник “Гематологія і переливання крові”. 2004.Вип.№32, част. 1. С. 7-12

12. Потапов В.М. Стереохимия. М.: Химия. 1988. 463 с.

13. Розанова С.Л., Науменко Е.И., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания // Проблемы криобиологии. 2010. Т.20, №3.С. 288-295.

14. Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов. М.: Наука, 1983. 43 с.

15. Шахпаронов М.И. Механизмы быстрых процессов в жидкостях. М.: Высшая школа, 1980. 325 с.

16. Щетинский М.И. Исследование взаимодействий криопротекторов с компонентами растворов и биологическими системами методом ЯМР. Автореф. дисс. … канд. биол.наук. Харьков, 1992.16 с.

## СОХРАННОСТЬ ДОНОРСКИХ ТРОМБОЦИТНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ

**Ветошкин К.А., Утемов С.В., Шерстнев Ф.С., Костяев А.А., Князев М.Г.**

*ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров, Россия*

E-mail: labcon@mail.ru

Потребность лечебно-профилактических учреждений в компонентах крови, с учетом современных принципов оказания трансфузионной терапии, имеет тенденцию к увеличению (Абдулкадыров К.М., 2005; Жибурт Е.Б., 2002; Pedrazzoli P. etal., 2000). Одним из основных гемотрансфузионных компонентов являются донорские тромбоцитные концентраты (ТК). Обычно используют свежезаготовленные донорские ТК. Следует отметить, что при положительных температурах (22±2°С) срок их хранения ограничен 3 - 5 сутками. Такие короткие сроки хранения концентратов кровяных пластинок диктуют необходимость создания их постоянных запасов.

Одним из способов увеличения продолжительности хранения ТК является их криоконсервирование. Обеспечение приемлемого количества функционально активных тромбоцитов достигается применением растворов хладоограждающих веществ и специальных программ охлаждения. В качестве криопротекторов для ТК ранее были изучены такие вещества, как глицерин (Компаниец А.М, 1992; Brodthagen U.A., 1985; Dajian G., 1976), диметилсульфоксид (Фефелова И.В., 1991; Kim B.K., 1976), 1,2-пропандиол (Воротилин А.М., 1992; Николенко А.В., 1990), диметилацетамид (ДМАЦ) (АграненкоВ.А. 1987; Захаров В.В., 1996; Цуцаева А.А., 1983; Djerassi I., 1971), гексаметиленбистетраоксиэтилмочевина (ГМБТОЭМ) (Селезнева О.М., 1996).

Анализ научных публикаций позволил сделать вывод о том, что оптимизация криоконсервирования тромбоцитов за счет применения в хладоограждающем растворе только одного криопротектора практически себя исчерпала. Создание многокомпонентных по составу криоконсервантов, а именно с использованием комбинаций проникающих и непроникающих в клетку криофилактиков, является актуальным и перспективным направлением в исследовании консервирования ТК путем замораживания.

Нами проведены исследования по разработке комбинированного криоконсерванта для донорских ТК на основе ГМБТОЭМ и ДМАЦ, определен его оптимальный состав. На разработанный раствор получен патент РФ №2477953.

Для изучения возможности долгосрочного хранения ТК их замораживали под защитой нового криоконсерванта по экспоненциальной программе до -80°С (Кузнецов К.В., 2006). Замороженные образцы хранили в течение 6 месяцев и 1 года, после чего размораживали, определяли концентрацию кровяных пластинок и их функциональную активность. Основные результаты исследований представлены в таблице (в процентах по отношению к уровню до замораживания).

При анализе сохранности свойств ТК после 6 месяцев хранения выявлено, что на 5,4% снижалось количество кровяных пластинок. Размороженные тромбоциты характеризовались высокой функциональной активностью. Так, степень их агрегации, индуцированной аденозиндифосфатом (АДФ), сохранялась на уровне 71,9% (от показателей нативных тромбоцитов), и 78% - при индукции адреналином. При проведении агрегометрии с двумя указанными индукторами выявлено, что размер образуемых тромбоцитами агрегатов оставался в пределах 64,5% от исходных значений при индукции АДФ и 59,1% - адреналином. Адгезия кровяных пластинок к стеклу составила 63,5% от показателя, зарегистрированного для нативных клеток. Наблюдалось снижение (на 8,7%) реакции восстановления тромбоцитов на гипотонический шок (РГШ).

При хранении ТК в течение 1 года при той же температуре наблюдались аналогичные изменения изученных показателей. Количество тромбоцитов снижалось на 9,7%. Уменьшались степень агрегации тромбоцитов и размер образуемых агрегатов при индукции АДФ до 65,9% и 67,3% соответственно, а при использовании адреналина те же показатели составили 75,3% и 73,1%. Адгезивность клеток к стеклу сохранилась на уровне 75,3%, а реакция восстановления после гипотонической нагрузки - 88,8%.

Таблица.

Сохранность свойств донорских ТК при замораживании до -80°С в зависимости от сроков хранения

<table>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">Показатель</td><td colspan="2">Срок хранения донорских ТК</td></tr>
<tr><td>6 месяцев</td><td>12 месяцев</td></tr>
<tr><td colspan="2">Количество тромбоцитов (%)</td><td>94,6±4,5<br>(n = 10)</td><td>90,3±4,2<br>(n = 10)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">АДФ – индуцированная агрегация (%)</td><td>степень агрегации, по Born</td><td>71,9±8,9</td><td>65,9±15,1</td></tr>
<tr><td>средний радиус агрегатов</td><td>64,5±10,9</td><td>67,3±9,5</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Адреналин-индуцированная агрегация (%)</td><td>степень агрегации, по Born</td><td>78,1±12,6</td><td>75,3±16,6</td></tr>
<tr><td>средний радиус агрегатов</td><td>59,1±18,8</td><td>73,1±21,1</td></tr>
<tr><td colspan="2">Адгезия к стеклу (%)</td><td>63,5±6,1</td><td>75,2±7,5</td></tr>
<tr><td colspan="2">Реакция на гипотонический шок<br>(10 минута; %)</td><td>90,9±3,9</td><td>88,8±3,1</td></tr>
</table>

При анализе сохранности свойств донорских ТК, хранившихся в замороженном состоянии под защитой нового криоконсерванта, в течение 6 и 12 месяцев, достоверных отличий в количестве, функциональной активности и показателях РГШ выявлено не было ($p<0,05$).

Вывод. Полученные результаты свидетельствуют о том, что криоконсервант на основе ГМБТОЭМ и ДМАЦ позволяет сохранить тромбоциты крови человека в функционально полноценном состоянии при -80єС как в течение 6 месяцев, так и 1 года.

**Литература**

1. Brodthagen U.A. Platelet cryopreservation with glycerol, dextran, and mannitol: recovery of 5-hydroxytryptamine uptake and hypotonic stress response / U.A. Brodthagen, W.J. Armitage, N. Parmar // Cryobiology. 1985. Vol. 22, N1. P. 1-9.

2. Dayian G. Cryopreservation of human platelets for transfusion: a glycerol-glucose, moderate rate cooling procedure / G. Dayian, A.W. Rowe // Cryobiology. 1976. Vol. 13, N1. P. 1-8.

3. Dimethylacetamide: a new cryoprotective agent for platelet / I.Djerassi, A. Roy, I.Kim, I.Cavish // Ibid. 1971. Vol.11, N2. P. 72 – 76.

4. Kim B.K., Tanoue K., Baldini M.G. Storage of human platelets by freezing // Vox Sang. 1976. Vol.30, N6. P. 401 – 411.

5. Pedrazzoli P., Noris P., Perotti C., Schiavo R., Ponchio L., Belletti S. Transfusion of platelet concentrates cryopreserved with ThromboSol plus low – dose dymethylsulfoxide in patients with severe thrombocytopenia: a pilot study. // British Journal of Haematology 2000. Vol. 108(3). P.653-659.

6. Абдулкадыров К.М. Гематология: Новейший справочник / К.М. Абдулкадыров // СПб.: Совет. 2005. 928 с.

7. Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Голубева В.Л. и др. Криоконсервированные тромбоциты и их клиническая эффективность // Гематология и трансфузиология. 1987. № 5. С. 22-24.

8. Захаров В.В. Консервирование тромбоцитов замораживанием при – $80^0$С под защитой диметилацетамида: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб, 1996.

9. Компаниец А.М. Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность: автореф. дис. … доктора мед. наук: 14.00.29 / Антонина Михайловна Компаниец. М., 1992. 52 с.

10. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А.А. Цуцавой. Киев: Наукова думка, 1983. 240 с.

11. Криоконсервирование тромбоцитов с диметилсульфоксидом / И.В. Фефелова, Д.М. Мхеидзе, Г.Д. Селидовкин и др. // Гематол. и трансфузиол. 1991. №6. С. 30 – 32.

12. Кузнецов К.В. Консервирование тромбоцитов замораживанием при -80°C по экспоненциальной програмне (экспериментальное исследование): автореф. дис.… канд. мед. наук. СПб. 2006. 23 с.

13. Николенко А.В., Компаниец А.М., Иванова И.А. Криопротекторные свойства веществ ряда полиолов при замораживании тромбоцитов // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. Харьков, 1990. С. 94 - 98.

14. Новый препарат «пропандиосахароль» - эффективный криоконсервант эритроцитов / А.М. Воротилин, В.М. Гучок, С.П. Калеко, Г.И. Петренко // Успехи современной криобиологии. II Международная конференция. Харьков, 1992. С. 34 – 35.

15. Селезнёва О.М. Криоконсервирование тромбоцитов с применением нового ограждающего раствора: Автореф. дис. … канд. биол. наук.С.-Петербург, 1996. 21 с.

**ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОБИОТИКОВ НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА У МЫШЕЙ**

**Высеканцев И.П., Бабинец О. М.**

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

E-mail: Olga.babinets@gmail.com

Микробиота кишечника оказывает существенное влияние на поддержание гомеостаза организма. Одним из наиболее важных аспектов взаимоотношений микробиоты и макроорганизма является регуляторная функция иммунной системы слизистой оболочки кишечника. Показано, что симбиотическая интестинальная микрофлора с одной стороны участвует в индукции толерантности иммунной системы слизистой оболочки к своим и к пищевым антигенам. С другой стороны обеспечивает иммунные реакции, в том числе эффективное распознавание и элиминацию микробных патогенов за счет развития воспаления и управления воспалительными механизмами (1).

Под воздействием различных физических, химических, биологических факторов возможно развитие дисбиоза (синдрома избыточного бактериального роста). Одним из клинических проявлений этого синдрома является нарушение регуляции воспалительного ответа, в том числе про- и противовоспалительных цитокинов (2, 3, 4, 5, 6).

Для восстановления микробиоценоза кишечника применяют различные пробиотические препараты. В настоящее время актуальным является создание иммобилизованных синбиотиков. Нами проведены исследования по созданию экспериментальных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на сорбентах и в гелях (7).

Целью исследования являлось сравнительное изучение влияния свободных и иммобилизованных на углеродсодержащих энтеросорбентах «Сорбекс» (Украина), «СУМС-1» (РФ) и в альгинатном геле *Lactobacillus bulgaricus* 1ZO3501, *Saccharomyces boulardii*, выделенных из коммерческого препарата «Энтерол»® (Biocodex, France), *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 на синтез про- и противовоспалительных цитокинов у мышей с экспериментальным химиотерапевтическим дисбиозом.

Иммобилизацию микробных клеток на сорбентах проводили по методу, описанному в (7), в альгинатном геле – в (8). Препараты свободных и иммобилизованных пробиотиков охлаждали до -40°С со скоростью охлаждения 1 град/мин, после чего погружали в жидкий азот. Экспериментальный дисбиоз воспроизводили у рандомбредных белых мышей посредством внутрижелудочного введения с помощью зонда метронидазола и ампициллина. За 2 суток до введения противомикробных препаратов у мышей формировали иммуносупрессию путем подкожного введения гидрокортизона ацетата. Применяли нативные препараты пробиотиков и препараты, хранившиеся при -196°С в течение 1 года. Контрольными группами служили животные, которым вводили нативные свободные клетки пробиотиков; криоконсервированные свободные клетки пробиотиков; смесь свободных нативных клеток пробиотиков с «Сорбекс», «СУМС-1», гранулами альгната натрия, соответственно; смесь криоконсервированных свободных клеток с «Сорбекс», «СУМС-1», гранулами альгината натрия, соответственно; группа без лечения. Интерлейкин (ИЛ) 10, ИЛ-4, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли (ФНО) α определяли в сыворотке крови твердофазным иммуноферментным методом с помощью наборов готовых реактивов, (ЗАТ «Вектор-Бест», РФ), соответственно. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Загальними принципами експериментів на тваринах», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Київ, Україна, 2001) и согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей» (Strasbourg, France, 1986). Для забора биоматериалов животных забивали с предшествующей премедикацией эфиром для наркоза. Состав пристеночной микрофлоры кишечника мышей определяли по стандартным методам.

Было установлено, что у животных с экспериментальным дисбиозом в сыворотке крови повышается уровень ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α. После проведения курса терапии указанными препаратами мы наблюдали восстановление кишечной микрофлоры во всех группах животных. Максимальный терапевтический эффект в отношении восстановления качественного и количественного состава пристеночной кишечной микрофлоры был получен после применения иммобилизованных препаратов. Достоверные различия в восстановлении микрофлоры после применения нативных и криоконсервированных препаратов отсутствовали.

Нормализация уровня цитокинов коррелировала с динамикой и выраженностью восстановления микрофлоры кишечника после введения свободных и иммобилизованных препаратов пробиотиков. Применение нативных и криоконсервированных пробиотиков в равной мере способствовало нормализации уровня цитокинов. На рисунке представлены результаты применения препаратов *Lactobacillus bulgaricus*. При применении *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* наблюдали аналогичные тенденции.

Рис. Цитокиновый профиль сыворотки крови мышей в конце периода наблюдения.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки препаратов иммобилизованных пробиотиков и методов их долгосрочного хранения для использования в медицинской и ветеринарной практике.

**Литература**

1. Имунная система слизистых, физиологическая микрофлора и пробиотики / Г. Н. Дранник, А. И. Курченко, А. Г. Дранник. К. : Полиграф плюс, 2009. 143 с.

2. Quigley, E. M. Small intestinal bacterial overgrowth: what it is and what it is not [Text] / E. M. Quigley // Current Opinion in Gastroenterology. 2014. Vol. 30., N. 2. P. 141-146.

3. Quigley, E. M. Diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in the clinical practice [Text] / E. M. Quigley // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2013. Vol. 2. P. 30-35.

4. Gabrielli, M. Cardiovascular risk in young adults [Text] / M. Gabrielli, G. D'angelo, T. Di Rienzo, E. Scarpellini, V. Ojetti // Scandinavian Journal of Gastroenterology. 1996. Vol. 31., N. 10. P. 977-984.

5. Riordan, S. M. Mucosal cytokine production in small-intestinal bacterial overgrowth [Text] / S. M. Riordan, C. J. McIver , D. Wakefield , V. M. Duncombe , T. D. Bolin , M. C. Thomas // PLoS One. 2012. Vol. 7., N. 11. P. e49315.

6. Johansson, M. A. Early-life gut bacteria associate with IL-4, IL-10 and IFN-γ production at two years of age [Text] / M. A. Johansson, S. Saghafian-Hedengren, Y. Haileselassie, S. Roos, M. Troye-Blomberg, C. Nilsson, E. Sverremark-Ekstrцm // PLoS One. 2012. Vol. 7., N. 11. Special section p1.

7. Высеканцев И. П. Сравнительное изучение адсорбции стандартных маркеров и пробиотиков Saccharomyces boulardii и Bifidobacterium bifidum на энтеросорбентах / Высеканцев И. П. Бабинец О. М., Марценюк В. Ф., Шатилова Л. Е. // Вісник проблем біології і медицини. 2011. Вип. 1, С. 58- 62.

8. Иммобилизованные ферменты / Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. и др. М.: Высш. шк., 1987. 159 с., ил.

## ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ РЕЖИМІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН *Escherichia coli M-17*, ІММОБІЛІЗОВАНИХ В ГЕЛЯХ

**Висеканцев І.П., Кудокоцева О.В., Буряк І.А., Петренко Т.П., Шатилова Л.Є., Дорофеєва Т.В.**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицины НАН України, Харків, Україна*

E-mail: vysekantsev49@mail.ru

На сьогоднішній день велику увагу приділяють розробці пробіотичних препаратів четвертого покоління – іммобілізованих форм пробіотиків

(Захарова И.Н., 2009). В основному, розробляють препарати бактерій, іммобілізованих на твердих носіях, найчастіше – на сорбентах, або в різних гелях (Соловьева И.Н., 2012). Маловивченим залишається питання розробки технологій довгострокового зберігання іммобілізованих препаратів пробіотиків.

Метою даної роботи було вивчення впливу різних режимів заморожування та температур зберігання на життєздатність клітин *Escherichia coli M-17*, іммобілізованих в гелях альгінату натрію і карагінана.

Штам *E.coli M-17* був отриманий шляхом висівання комерційного препарата «Колібактерин» (ВАТ «Біомед» ім. І.І. Мечникова, Московська область, Красногорський р-н, с. Петрово-Дальнє).Бактерії культивували на скошеному крильовому поживному агарі при температурі 37°С протягом 24 годин. Суспензію клітин готували шляхом змивання культури мікроорганізмів з агару середовищем М9 (Миллер Дж., 1976).Клітини *E.coli M-17* іммобілізували шляхом включення їх у гелі альгінату натрію, к-каррагінану, а також шляхом включення в гранули вказаних гелів.Гелі додавали до суспензії клітин *E.coli M-17* у співвідношенні 1:1 (v/v). В контрольні зразки замість гелів додавали середовище М9 (1:1). Включення бактерій в гранули альгінату натрію та карагінана здійснювали за методикою (Tsen J.-H. Et al., 2007). Отримані гранули після стабілізації переносили у стерильні флакони об'ємом 10 мл по 10 штук в кожний.Гелі з іммобілізованими в них бактеріями розливали в кріопробірки фірми "Nunc" (США) з робочим об'ємом 1,8 мл по 1,5 мл. Експозиція клітин *E.coli M-17* в гелях складала 15 хвилин, після чого зразки заморожували.Гранули також поміщали в кріопробірки фірми "Nunc" по 10 штук в кожну.

Режими заморожування:

1) охолодження зі швидкістю 1 град/хв до -40°С з наступним зануренням в рідкий азот;

2) охолодження зі швидкістю 20 град/хв до -40°С з наступним зануренням в рідкий азот;

3) охолодження з неконтрольованою швидкістю до -196°С шляхом занурення в рідкий азот.

Відігрівання зразків проводили на водяній бані при температурі 37°С.

Життєздатність бактерій *E.coli M-17* визначали «чашковим» методом Коха по здатності клітин утворювати макроколонії на щільних поживних середовищах. При цьому клітини, іммобілізовані в блоках гелів, не відмивали перед висіванням на поживний агар. Гранули гелів з іммобілізованими клітинами *E.coli M-17* перед висіванням розчиняли. Для цього до 10 гранул альгінату та каррагінану додавали 10 мл 4% розчину ЕДТА і фізіологічного розчину, відповідно.Контролем слугували зразки бактерій у відповідних гелях, які не були заморожені.

Для вивчення впливу умов зберігання на життєздатність іммобілізованих бактерій *E.coli M-17* зразки поміщали у холодильні камери з температурними режимами 4°, –20°, –80°С, а частину зразків заморожували зануренням в рідкий азот до –196°С. При зазначених температурах зразки зберігали протягом 6 місяців. Відразу після охолодження, а також після закінчення строків зберігання (1 доба, 1 місяць, 3 місяця і 6 місяців) зразки відігрівали на водяній бані при 37°С і визначали кількість життєздатних бактерій *E.coli M-17* в них.

Показники життєздатності іммобілізованих клітин *E.coli M-17* після заморожування за різними режимами наведені у табл.

Таблиця.

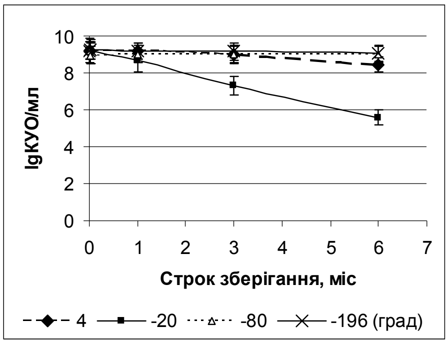
Життєздатність клітин *E.coli M-17* в гелях після заморожування за різними програмами

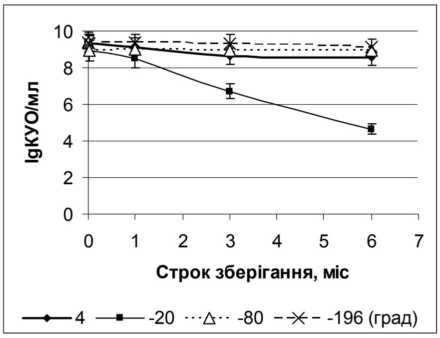
| Середовище консервування | lgКУО/мл в зразках до заморожування | lg КУО/мл в зразках після заморожування з різними швидкостями | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1°С/хв | 20°С/хв | Занурення у рідкий азот |
| М9 | 9,53±0,03 | 9,25±0,04 | 9,44±0,02 | 9,50±0,03 |
| 1% альгінат натрію | 9,62±0,04 | 9,43±0,04 | 9,52±0,03 | 9,62±0,05 |
| 1% карагінан | 9,60±0,05 | 9,54±0,03 | 9,44±0,04 | 9,61±0,01 |

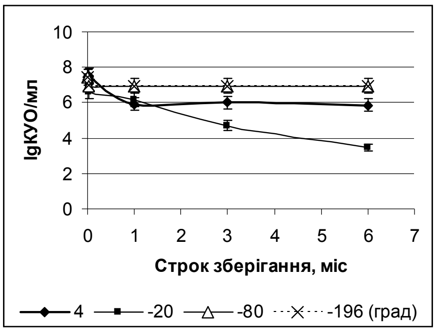
Встановлено, що при охолодженні клітин *E.coli M-17* в середовищі М9 зі швидкостями 1 град/хв і 20 град/хв до –40°С з наступним зануренням в рідкий азот та при заморожуванні з неконтрольованою швидкістю до –196°С життєздатність бактерій (lg КУО/мл) складала 9,25±0,04; 9,44±0,04; 9,50±0,03, відповідно, що недостовірно відрізнялося від контролю (табл.).

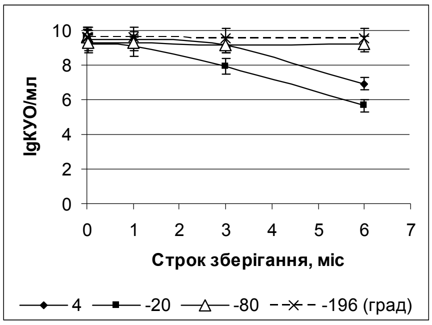
Охолодження іммобілізованих бактерій в гелях 1% альгінату та 1% каррагінану при вказаних вище режимах заморожування достовірно не впливало на життєздатність клітин (табл.).

Результати вивчення життєздатності клітин *E.coli M-17*, суспендованих в середовищі М9, та клітин, іммобілізованих у блоках і гранулах гелів альгінату та карагінана, після зберігання при різних температурах наведені на рис.



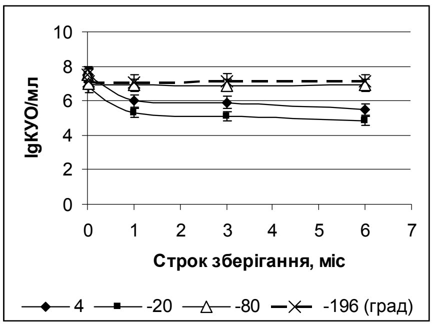




Рис. 1. Динаміка життєздатності бактерій *E.coli M-17* при зберіганні в умовах помірних та низьких температур: а – в средовищі М9; б – в блоках альгінату; в – в гранулах альгінату; г – в блоках карагінана; д – в гранулах карагінана

Охолодження суспензії клітин *E.coli M-17* в середовищі М9 до 4°С і наступне зберігання при даній температурі протягом доби не призводило до достовірного зниження життєздатності (рис. 1а).

Встановлено, що клітини, які зберігалися в середовищі М9 при 4°С протягом 1 доби, 1 місяця та 3 місяців, зберігали високу життєздатність, яка достовірно не відрізнялася від контролю. При зберіганні клітин протягом 6 місяців кількість життєздатних клітин зменшувалась на 0,75 lg в порівнянні з контролем.

В процесі охолодження до -20°С в середовищі М9 достовірне зменшення життєздатності починається після 1 місяця зберігання і складає 8,66±0,05 lgКУО/мл, а 6-місячне зберігання призводило до зниження життєздатності на 3,62 lgКУО/мл.

Охолодження до –80°С і наступне зберігання протягом 6 місяців не призводило до загибелі клітин, які перебували в середовищі М9.

На етапі охолодження клітин до –196°С в середовищі М9 спостерігали таку ж саму картину, що і при –80°С.

При зберіганні *E.coli M–17* в альгінатному гелі при температурі 4°С достовірне зниження життєздатності починається з 3-місячного зберігання, а через 6 місяців lgКУО/мл складає 8,54±0,08, що на 0,83 lg нижче, ніж в контролі (рис. 1 б).

Охолодження зразків клітин, іммобілізованих в 1% альгінаті, до –20°С призводило до загибелі клітин *E.coli M–17* через 1 місяць зберігання, кількість життєздатних бактерій складала 8,53±0,04 lgКУО/мл. Через 3 і 6 місяців спостерігали суттєве зниження життєздатності на 2,67 і 4,73 lg в порівнянні з контролем, відповідно.

Зберігання бактерій *E.coli M-17*, які були іммобілізовані в альгінатному гелі, при –80°С і -196°С не призводило до їх загибелі протягом 6 місяців спостерігання.

Для бактерій *E.coli M-17*, іммобілізованих в альгінатних гранулах, при температурі зберігання 4°С загибель клітин починаєтся з 1 місяця, а через 6 місяців жттєздатність складає 5,85±0,05 lgКУО/мл, що на 1,61 lg нижче, ніж в контролі (рис. 1 в).

При охолодженні іммобілізованих бактерій в гранулах альгіната до –20°С загибель клітин починається через 1 добу спостереження, а через 3 і 6 місяців зберегання життєздатність знижується на 2,76 і 4 lg відносно контролю, відповідно.

При заморожуванні клітин, іммобілізованих в альгінатних гранулах, до –80°С та –196°С через 1 добу зберігання життєздатність *E. coli M-17* достовірно знижується, але через 6 місяців збереження клітин в цих же умовах життєздатність зменшується лише на 0,56 та 0,50 lgКУО/мл, відповідно.

В експериментах по зберіганню клітин *E.coli M*-17 , що були іммобілізовані в блоках 1% карагінана, при 4°С достовірне зниження життєздатності відмічено через 6 місяців спостереження (Рис. 1 г). Зберігання клітин при –20°С призводить до їх загибелі через 3 місяця спостереження, а при $-80^{o}C$ – через 6 місяців. Температурний режим зберігання $-196^{o}C$ сприяє збереженності життєздатності клітин на рівні контролю протягом усього 6-місячного терміну.

При зберіганні клітин, іммобілізованих в гранулах каррагінану, за температури $4^{o}C$ достовірне зниження життєздатності починається через 1 місяць спостереження з подальшим зниженням, через 6 місяців життєздатність знижувалась на 2,65 lg порівняно з контролем (рис. 1 д).

Клітини в гранулах каррагінана при $-20^{o}C$ починали гинути вже через 1 добу спостереження, в той час як при температурах $-80^{o}C$ і $-196^{o}C$ клітини *E. coli M–17* залишалися життєздатними протягом 6 місяців.

Таким чином встановлено, що після зберігання протягом 6 місяців при –80 і –196°C кількість життєздатних іммобілізованих клітин *E.coli M-17* достовірно не змінюється. Після зберігання при 4 і –20 кількість життєздатних вільних та іммобілізованих клітин *E.coli M-17* достовірно зменшується. Найбільш низькі показники життєздатності вільних та іммобілізованих бактерій спостерігали після зберігання при –20°C.

Отримані результати свідчать про захисну дію гелів альгінату натрію та каррагінану не тільки при низьких температурах, але й в процесі зберігання при 4 та –20°C. Дані про динаміку загибелі клітин, іммобілізованих в гелях, після зберігання при 4 та –20°C та про стабільність їх життєздатності під час зберігання при –80 і –196°C свідчать про різні механізми летальних пошкоджень при субнульових температурах та при різних температурах нижче 0°C. Життєздатність клітин при температурах, близьких до 0°C, залежить від впливу низки фізико-хімічних факторів, пов'язаних з фазовими і фазово-структурними перетвореннями внутрішньої та позаклітинної води. В зоні температур від 0 до –80°C відбувається кристалізація внутрішньої і позаклітинної води. Евтектична температура багатьох солей знаходиться нижче –20°C, і клітини, що зберігаються при цій температурі, піддаються тривалому впливу кристалічних структур і рідкої фази. З цим і пов'язані найбільш низькі показники збереженості всіх зразків при вказаній температурі. За температур від –80 °C до –130°C завершується кристалізація зв'язаної води. При –196°C процеси кристалізації не відбуваються. Клітини знаходяться в стані холодового анабіозу, що зумовлює найкращі показники життєздатності клітин у заморожених зразках.

**Література**

1. Tsen J.-H. Freezing resistance improvement of Lactobacillus reutery by using cell immobilization / J.-H. Tsen , H.-Y. Huang, Y.-P. Lin, V. A.-E. King // Journal of Microbiological methods. 2007. V. 70. PP. 561 – 564

2. Захарова И.Н. Современные пробиотики для коррекции микробиоценоза кишечника у детей / И.Н. Захарова, Л.Н. Мазанкова, Ю.А. Дмитриева // Вопросы современной педиатрии. 2009. Т. 8, №2. С. 113 – 117

3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / пер. с англ. под ред. Алиханяна С.И. М.: Мир, 1976. 436 с.

4. Соловьева И.В. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика / И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, И.В. Белова и др. // Микробиология и эпидемиология. Вестник Нижегородского университета им. А.Н. Лобачевского. 2012. №2(3). С. 85 – 92

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ

**Водопьянова Л.А., Денисова О.Н., Жегунов Г.Ф.**

*Харьковская государственная зооветеринарная академия, Харьков, Украина*

E-mail: vodopyanova@mail.ru

Костный мозг - это комплекс гемопоэтических клеток, которые поддерживают гемопоэз в период жизни животного. Высокий терапевтический потенциал клеток костного мозга (ККМ) дает возможность использовать их при лечении различных нарушений гемопоэза. Таким образом, клиническая потребность в костном мозге постоянно возрастает и требует создания резерва биоматериала. Известно, что в замороженном состоянии биообъекты хранятся продолжительное время, это позволяет создавать банки клеточного материала. Использование криопротекторов снижает негативные последствия замораживания-отогрева и сохраняет клетки до трансплантации (Baust J. G., 2007), но эффективные способы криоконсервирования ККМ домашних животных еще не разработаны. Мы проводили оценку влияния криопротектора ДМСО и замораживания-отогрева на морфофункциональное состояние костного мозга собак.

**Материалы и методы исследования.** ККМ были получены от 3-4 летних собак (n = 10). ККМ получали методом костномозговой пункции с дальнейшей обработкой криопротектором. Диметилсульфоксид (ДМСО) постепенно добавляли в суспензию ККМ до конечной концентрации 5 %, 7 % и 10 % при 4°С. Инкубация при 4°С с ДМСО длилась в течении 10 мин. Замораживание проводили в пластиковых контейнерах "Eppendorf" по двухэтапной программе (Гольцев А.М., 2005, Kawano Y., 2004 ). После отогрева и удаления ДМСО клетки переносили в фосфатный буфер и определяли содержание метаболитов. Для определения сохранности клетки окрашивали трипановым синим. Определение содержания метаболитов проводили в безбелковом экстракте из свежеполученных ККМ собак, а так же отмытых от 7 % и 10 % ДМСО после инкубации и замораживания-отогрева. Данные регистрировали спекрофотометрически на СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 340 нм. Содержание метаболитов выражали в мкмоль/г белка. Определение общего количества белка проводили по методу Бредфорд. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера с использованием программы Microsoft Office Excel.

**Результаты исследования.** Ранее нами были проведены сравнительные исследования показателей сохранности ККМ собак после замораживания-отогрева в присутствии непроникающих и проникающих криопротекторов (ДМСО, глицерин, полиэтиленгликоль-400). ДМСО показал себя более перспективным криопротектором, поэтому, при изучении важнейших энергетических субстратов клетки мы использовали ряд концентраций ДМСО. После замораживания-отогрева с ДМСО в концентрации 7% сохранность ККМ составляет до 80%, при этом отмечается широкий клеточный спектр (табл. 1). В связи с этим в дальнейших исследованиях использовали концентрации ДМСО обеспечившие наибольшую сохранность ККМ собак.

Таблица 1.

Сохранность ККМ

| ККМ | сохранность ККМ, % | |
|---|---|---|
| | инкубация | замораживание-отогрев |
| интактные ККМ | 98,26±0,3 | - |
| без криопротектора | 97,16±1,84 | 5,7±2* |
| ДМСО 10% | 87,63±1,69* | 82,92±2* |
| ДМСО 7% | 89,72±1,68* | 83,51±1,9* |
| ДМСО 5% | 89,91±1,23* | 60,43±2,34*# |

* - значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль), $P < 0,001$. # - значения достоверны относительно клеток после инкубации с криопротектором, $P < 0,001$.

Одним из критериев жизнеспособности и функциональной полноценности является состояние энергетической системы клетки. Установлено, что изменения в содержании АТФ и Г-6-Ф в клетках происходят уже на этапе инкубации. Причем снижение уровня этих веществ, происходит как в присутствии криопротектора в среде инкубации, так и без него (табл. 2). При этом не происходит достоверных изменений в содержании ПВК. Уровень молочной кислоты в клетках, инкубированных без криопротектора, не повышается относительно контроля, а в присутствии ДМСО повышается на

25 % и 9 % соответственно с 10 % и 7% ДМСО. После криоконсервирования клеток с ДМСО наблюдается небольшое увеличение уровня Г-6-Ф и лактата в сравнении с данными контроля. При этом отмечено незначительное снижение уровня АТФ.

При воздействии растворов криопротекторов и температур близких к $0^0$С, скорость и согласованность биохимических процессов в клетках изменяется (Idei K., 2008). При этом повышаются расходы энергетического потенциала, вызванное многочисленными факторами: переход на анаэробный гликолиз в клетках *in vitro*, угнетение биологического окисления различными ингибиторами, формирование дополнительных путей метаболизма, идущих на устранение повреждающих факторов и др. (Patel S.D., 2000). Этим можно объяснить изменения в содержании АТФ и Г-6-Ф в ККМ собак на этапе инкубации. Известно, что ККМ зачастую используют анаэробный гликолиз для синтеза АТФ (Murdoch C. 2005, Weisdorf D.J. 1982). Продолжительное хранение ККМ *in vitro* невозможно, так как в клетках уменьшается окислительное декарбоксилирование ПВК и повышается образование лактата, а его накопление губительно для клетки. Замедление метаболизма, вплоть до минимальной потребности в глюкозе и АТФ, возможно только при криоконсервировании. Снижение уровня АТФ после криоконсервирования, возможно связано с повышением затрат энергетического материала на восстановление структуры и функций в клетках, что влечет за собой компенсаторное увеличение уровня Г-6-Ф (табл. 2).

Снижение уровня ПВК и повышенное содержание молочной кислоты после отогрева, свидетельствует о доминировании анаэробных процессов в размороженных клетках, однако аэробное получение энергии возможно сразу после введения клеток *in vivo*. Полученные данные, подтверждают предположение о существовании зависимости между уровнем энергетического обмена и сохранностью криоконсервированых ККМ. Применение 7% ДМСО способствует не только высокой сохранности ККМ собак, но и сохранению уровня Г-6-Ф, АТФ, ПВК.

**Выводы.** Восстановление метаболизма и прежде всего энергетических процессов в клетках зависит от морфофункциональных изменений . Криоконсервирование ККМ собак с применением ДМСО позволяет сохранить уровень энергетического обмена в клетках на приемлемом для трансплантации уровне.

Таблица 2.

Содержание субстратов энергетического обмена в ККМ собак

| ККМ | субстрат энергетического обмена (мкмоль/г белка) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | АТФ | Г-6-Ф | ПВК | лактат |
| интактные ККМ | 2,318± 0,067 | 0,702± 0,042 | 0,141±0,01 | 1,256±0,063 |
| инкубированные без криопротектора | 2,000±0,028* | 0,500±0,06*** | 0,145±0,004 | 1,310±0,079 |
| инкубированные с ДМСО 10% | 2,091±0,05* | 0,750±0,045 | 0,156±0,002 | 1,318±0,07** |
| инкубированные с ДМСО 7% | 2,208±0,09 | 0,686±0,052 | 0,149±0,003 | 1,130±0,08 |
| криоконсервированные с ДМСО 10% | 1,737±0,108** | 0,809±0,027* | 0,166±0,004**# | 1,567±0,069** # |
| криоконсервированные с ДМСО 7% | 2,046 ±0,087* | 0,852±0,052***# | 0,163±0,003* | 1,371±0,043** # |

* - значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль), Р < 0,05. ** - значения достоверны относительно контроля, Р < 0,01. *** - значения достоверны относительно контроля, Р < 0,001. # - значения достоверны относительно клеток после экспозиции с криопротектором, Р < 0,05.

**Литература**

1. Baust J. G., Advances in biopreservation / Baust J. G, Baust J. M. // Ed. by - By Tayloor & Francis Group. LLC. 2007. P. 15 - 62.

2. Гольцев А.М. Оценка гемопоэтического потенциала стволовых кроветворных клеток костного мозга с измененным исходным статусом под действием факторов криоконсервирования / А. М. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Ю. А. Козлова, Т. М. Гурина, М. В. Останков // Проблемы криобиологии. 2005. Т. 15, №3. С. 320-323.

3. Kawano Y. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer / Y. Kawano, C. L. Lee, T. Watanabe, T. Abe // Ann. Hematol. 2004. Vol. 83, №1. P. 50-54.

4. Idei K. Investigation of Various Methods for the Cryopreservation of Canine Bone Marrow- Derived CD34+ Cells / K. Idei, S. Matsuura, Y. Fujino // J. Vet. Med. Sci. 2008. Vol. 70, №11. P. 1211–1217.

5. Patel S.D. The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic

cell cultures / S D. Patel, E. T. Paroutsakis, J. N. Winter, W. M. Muller // Biotechnol. Prog. 2000. Vol. 16, № 5. P. 885-892.

6. Murdoch C. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation / C. Murdoch, M. Muthana, C. E. Lewis // The Journal of Immunology. 2005. Vol.175, №10. P. 6257-6263.

7. Weisdorf D.J. Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis / D.J. Weisdorf, P. R. Craddock, H. S. Jacob // Inflammation. 1982. Vol. 6, № 3. P. 245-256.

## СОСТОЯНИЕ ГЕНА GATA2 В СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТКАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ РАЗНЫХ СРОКОВ ГЕСТАЦИИ

**Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останков М.В., Гаевская Ю.А., Ямпольская Е.Е., Дубрава Т.Г.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail:cryopato@rambler.ru

Среди препаратов клеточной и тканевой терапии особое место занимает фетальная печень (Гольцев А.Н., 2008; Сухих Г.Т., 2008). Ее уникальный терапевтический потенциал продемонстрирован в самых различных ситуациях. При этом в сравнительном аспекте редко анализируется эффективность применения фетальной печени разных сроков гестации. Важность такого анализа заключается в том, что в процессе эмбриогенеза существенно меняются структурные и функциональные характеристики многих составляющих компонентов фетальной печени, но, прежде всего стволовых кроветворных клеток (СКК). Именно эти ключевые компоненты фетальной печени рассматриваются как потенциальные клетки-корректоры гемопоэза при лечении аутоиммунных патологий (Goltsev A.N., 2011).

Зависимость терапевтического эффекта клеток фетальной печени (КФП) от срока гестации возрастает еще в большей степени при использовании криоконсервированного материала (Гольцев А.Н., 2009). Действительно, характер влияния криоконсервирования на биообъект строго зависит от его исходного состояния. Продемонстрирована зависимость сохранности СКК от нахождения в той или иной фазе клеточного цикла, уровня дифференцировки и т.д. (Гольцев А.Н. 1988). Вместе с тем, в последнее время акцентируется внимание на необходимости аттестации после криоконсервирования геномного и постгеномного профиля клеток стволового компартмента (Fuller B., 2004; Storey K.B., 2004). Для СКК и МСК, принимающих участие в коррекции жестких аутоиммунных заболеваниях гемопоэтического плацдарма, особую значимость представляет оценка состояния гена *gata2.*

Цель - провести оценку уровня экспрессии гена *gata2* в стволовых кроветворных клетках фетальной печени разных сроков гестации до и после криоконсервирования.

Объектом исследования были КФП мышей линии СВА/Н 14-х (КФП-14) и 18-х (КФП-18) суток гестации и выделенная из них на магнитном сортере (BD Imagnet™) фракция СКК. Фракцию СКК получали методом негативной селекции с помощью Biotinylated Mouse Lineage Depletion Cocktail ($Lin^-$) и Streptovidin Magnetic Particles-DM с последующей позитивной селекции с использованием CD117 MicroBeads.

Суспензию КФП криоконсервировали в пластиковых ампулах (Nunc, Германия) в объеме 1,8 мл с концентрацией клеток $2x10^6$ кл/мл. Выделенную фракцию стволовых клеток с той же концентрацией замораживали в соломинках (minitubes d - 0,25 mm, Германия) под защитой криопротектора 10% диметилсульфоксида по двухэтапной программе со скоростью $1^0$С/мин до $-25^0$С и последующим погружением в жидкий азот ($-196^0$С).

Уровень экспрессии гена *gata2* в цельной и фракционированной суспензиях КФП-14 и КФП-18 оценивали методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) в течение часа после размораживания (Херрингтон С., 2009) по наличию их ампликонов. Общую РНК выделяли с помощью набора Diatom RNA Prep 100 (Isogene Lab, Ltd, Россия) из $1x10^5$ клеток каждого образца. Полученную смесь нуклеиновых кислот обрабатывали ДНКазой I согласно инструкции производителя (ООО «Синтол», Россия). Реакцию ОТ ставили с использованием random-олигонуклеотидов и ревертазы (M-Mlv) (НИИЭ МЗ РФ, «Реверта L», Россия) Праймер к исследуемому гену был сконструирован на основе базы данных «GenBank» (NCBI BLAST, USA): *gata2* - NM_008090.5 (fragment length 272 n.p) и синтезирован в АОЗТ «Медбиосервис» (Киев). Детекцию продуктов амплификации проводили методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» (США).

Сравнение количества транскриптов исследованных мишеней проводили на основе относительной количественной оценки продуктов амплификации. Кратко: готовили последовательные десятикратные разведения исходного препарата кДНК из каждого исследуемого образца. К каждому разведению добавляли реакционную смесь и проводили амплификацию. Чем меньше в исходном препарате было последовательностей-мишеней, тем раньше (то есть при меньших разведениях) прекращалась амплификация. Логарифм разведения (lg) кДНК служил показателем уровня экспрессии исследуемых генов. Результаты были нормированы по отношению к показателю экспрессии гена *beta actin* (housekeeping gene) (NM_007393.3). Отрицательным контролем была реакционная смесь без кДНК.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы MS Excel.

В процессе эмбриогенеза структурно-функциональные характеристики СКК фетальной печени, включая рецепторный репертуар, профиль продуцируемых регуляторных медиаторов, экспрессию генов пролиферации и дифференцировки и др. существенно изменяются (Гольцев А.Н., 2009; Serls A.E., 2005; Zhao R., 2005), что не может не отражаться на их криоустойчивости.

Выяснение характера влияния криоконсервирования на генетический профиль клеток стволового компартмента представляет интерес с точки зрения перспектив применения и прогноза терапевтической активности криоконсервированных КФП разных сроков гестации. Выбор гена *gata2* обусловлен тем, что он играет важную роль в раннем гемопоэзе и отвечает за самоподдержание СКК (Gudmundsson K.O., 2007).

Как видно на рис., содержание транскриптов гена *gata2* в суспензии нативных КФП снижается при увеличении срока гестации. В выделенной фракции $CD117^+$ клеток отмечена такая же тенденция изменения экспрессии гена *gata2*, но с еще большими различиями. Криоконсервирование в обеих суспензиях вызывало противоположный эффект, а именно, снижение содержания транскриптов в КФП-14 и увеличение – в КФП-18. Важно заметить, что после криоконсервирования и отогрева экспрессия гена *gata2* в суспензии КФП-18 и выделенной фракции $CD117^+$ была даже выше таковой в нативных КФП-14. То есть, в отношении гена *gata2* в КФП-18, криоконсервирование проявляло «ревитализирующий» эффект. К тому же, максимальная степень экспрессии гена *gata2* в выделенной фракции СКК этого срока гестации может подчеркивать роль акцессорно-регуляторных клеток микроокружения в управлении состоянием СК.

Существенно, что общие закономерности изменения уровня экспрессии гена *gata2* имели место даже при некоторых различиях условий криоконсервирования нефракционированной суспензии и выделенных фракций стволовых клеток.

Выводы. По мере пролонгации сроков гестации уровень экспрессии гена *gata2* в СКК фетальной печени снижается.

После криоконсервирования уровень экспрессии исследуемого гена в фетальной печени 18 суток гестации существенно повышается, превосходя таковой даже в нативном материале ранних сроков гестации.

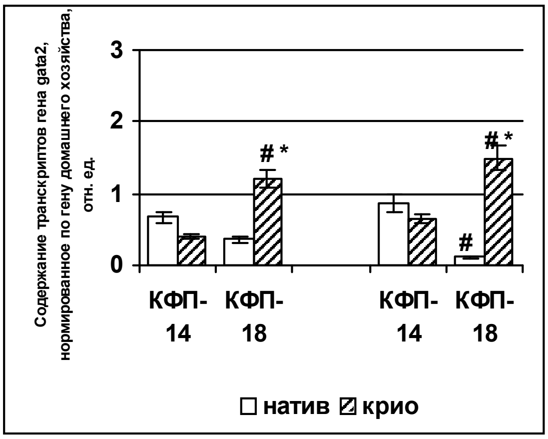



Рис. Полуколичественный анализ экспрессии гена *gata2* в суспензиях КФП и фракциях клеток CD117$^{+}$(СКК).

Примечание: * - различия достоверны по отношению к соответствующему нативному контролю, # - различия достоверны по отношению к кКФП-14, (P<0,05).

Данный факт подчеркивает способность криоконсервирования реализовать «ревитализирующий» эффект в отношении СКК фетальной печени поздних сроков гестации, что расширяет возможности использования такого материала в клинической практике.

**Литература**


1. Fuller B., Green C., GrischenkoV.I. 2004, Cooling, cryopreservation and gene expression in mammalion cells, *Problems Cryobiol.* (3): 58-71.
2. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dimitrov A.Yu. et al. 2011, Peculiarities of functional state modulation of genetic apparatus of fetal liver cells with stemness characteristics after cryopreservation, *Cryoletters*. 32(6): 543-544.
3. Gudmundsson K.O., Thorsteinsson L., Sigurjonsson O.E. 2007, Gene expression analysis of hematopoietic progenitor cells identifies Dlg7 as a potential stem cell gene, *Stem Cells*, 25(6): 1498-506.
4. Serls A.E., Doherty S., Parvatiyar P., Wells J.M., Deutsch G.H. 2005, Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung, *Development*. 132: 35-47.
5. Storey K.B. 2004, Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance, *Cryobiology*. 48: 134-145.
6. Zhao R., Watt A.J., Li J., Luebke-Wheeler J., Morrisey E.E., Duncan S.A. 2005, GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation, *Mol.Cell Biol*. 25: 2622-2631.

7. Гольцев А.Н. 1988, Влияние факторов криоконсервирования на иммунологические свойства кроветворных клеток костного мозга, *Автореф. дис.. док.мед.наук,* Харьков: 35 с.

8. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В., и др. 2009, Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации, *Пробл. криобиологии*. 19(2): 186-199.

9. Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Мацевитая И.Ю. и др. 2008, Криоконсервированный аллогенный костный мозг – новая мишень иммуномодулирующей активности клеток фетальной печени, *Проблемы криобиологии.* 18(3): 313-315.

10. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М. 2008, Перспективы использования фетальных стволовых/прогениторных клеток человека в клеточной терапии, *Клеточные технологии в биологии и медицине*. (8): 5-13.

11. Херрингтон С., Макги Дж. 1999, *Молекулярная клиническая діагностика,* Москва, Мир: 558 с.

## ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**Гольцев А.Н., Останков М.В., Лебеденец В.В., Гольцев К.А., Кожина О.Ю., Бондарович Н.А.**

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

Кордовая кровь человека (ККЧ) является признанным источником стволовых клеток и биологически активных веществ. Длительное хранение этого уникального биоматериала возможно в условиях низкотемпературного банка. В данной работе исследовали влияние криоконсервирования по двухэтапной программе замораживания на цитоморфологические и функциональные характеристики клеток лейкоконцентрата ККЧ (ЛККЧ). Показано, что после криоконсервирования под защитой высокомолекулярного декстрана происходит перераспределение в клеточном составе ЛККЧ за счёт снижения содержания гранулоцитов, повышения недифференцированных клеток и макрофагов. Достаточно высокую устойчивость к воздействию факторов криоконсервирования имели стволовые и ранние клетки-предшественники. Отмечали снижение общей бактерицидной активности клеток ЛККЧ и повышение фагоцитарной активности макрофагов.

***Ключевые слова:*** кордовая кровь человека, ядросодержащие клетки крови, криоконсервирование.

В настоящее время в мире ведется активная научно-исследовательская работа по изучению свойств и характеристик клеток кордовой крови человека (ККЧ) (Гольцев К.А. 2011, Грищенко В.И., 2001). Благодаря многокомпонентному клеточному составу суспензии ККЧ, наличию в ней комплекса биологически активных соединений (Бойко В.В., 2001, Гольцев А.Н, 1998), обеспечивающих рост и созревание тканей и органов плода (Гольцев К.А. 2011), расширяется спектр показаний для клинического применения ККЧ (Бойко В.В., 2001, Гольцев К.А. 2011).

Для длительного хранения ККЧ и последующего использования в медицинской практике необходимо создать низкотемпературный банк, в котором биоматериал будет содержаться при температуре жидкого азота (Цуцаева А. А., 2000, Berz D., 2007). По мнению ряда ученых и врачей, создание запасов пуповинной крови должно стать одним из приоритетных направлений развития здравоохранения на ближайшие годы (Лобынцева Г.С., 2007).

В ИПКиК НАН Украины был разработан и запатентован способ получения лейкоконцентрата ККЧ (ЛККЧ) в аутологичной плазме с последующим его криоконсервированием без использования традиционных криопротекторов (Цуцаєва А.О., 2000). Условиями успешного применения криоконсервированного ЛККЧ (кЛККЧ) являются высокая сохранность и функциональная полноценность биоматериала после замораживания-отогрева и низкотемпературного хранения.

Наиболее доступный метод оценки клеточного спектра ЛККЧ с помощью световой микроскопии даёт лишь общую информацию о составе суспензии, но не позволяет однозначно судить о содержании отдельных субпопуляций. Использование же современных возможностей проточной цитофлуориметрии обеспечивает точность и полноту определения клеточного состава ЛККЧ. Поэтому проведение сравнительного анализа морфологических, иммунофенотипических и функциональных характеристик клеток ЛККЧ до и после его криоконсервирования позволит дать более полную оценку модифицирующего влияния низких температур на клетки кордовой крови человека кордовой крови человека.

***Цель работы –*** изучение морфологических, иммунофенотипических и функциональных свойств клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования, оценка их сохранности после замораживания-отогрева.

**Объектом** исследования была ККЧ, которую получали из материнского конца пуповины после ее отделения при доношенной беременности у здоровых рожениц после подписания ими информированного согласия. Кровь отбирали в стерильные флаконы с добавлением антикоагулянта CPD (цитрат-фосфат-декстрозный раствор) с соблюдением правил асептики и антисептики (Цуцаева А. А., 2000). Из ККЧ получали лейкоконцентрат (ЛККЧ) в аутоплазме методом седиментации эритроцитов (Цуцаева А. А., 2000).

Лейкоконцентрат ККЧ замораживали в одноразовых пластиковых криопробирках («Nunc», США) по двухэтапной программе в растворе высокомолекулярного декстрана (полиглюкина, «Юрия-Фарм», Украина) (Цуцаєва А.О., 2000). Образцы криоконсервированного ЛККЧ (кЛККЧ) хранили в низкотемпературном банке ИПКиК НАН Украины. Суспензию кЛККЧ отогревали на водяной бане при температуре 40-41$^{o}$C (Гольцев А.Н., 1998).

Количество ядросодержащих клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике (Саркисов Д.С., 1996). Сохранность клеток ЛККЧ определяли до криоконсервирования и в первые 5 мин после замораживания-отогрева экспресс-методом суправитального окрашивания трипановым синим (Саркисов Д.С., 1996) и по включению флуоресцентного красителя – пропидиум йодида (Мороз Б.Б., 2001). Популяционный состав ЛККЧ исследовали методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD Biosciences, США) и программы Win MDI с использованием моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD34, CD56 (BD, США). Клеточный состав ЛККЧ до и после криоконсервирования оценивали на мазках, окрашенных азур-II-эозином по Романовскому под световым микроскопом (BIOLAR, Польша) ок. x10 и об. x40, x90 (масляная иммерсия).

Функциональную активность клеток ЛККЧ до и после криоконсервирования определяли после их осаждения центрифугированием при 1500 об/мин при 20°C в течение 40 мин, надосадок удаляли, клетки ресуспендировали в стерильном рингер-фосфатном буфере (Цуцаева А. А., 2006) до необходимой концентрации.

Оценку фагоцитарной активности моноцитов и макрофагов ЛККЧ проводили после инкубации с убитой культурой стафилококка S. Aureus в соотношении 1:2 под световым микроскопом ЛОМО; ок. x10, об. x90 (масляная иммерсия). Определяли фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ) и абсолютный показатель фагоцитарной активности (АПФА) (Александров М.Г., 1998).

Метаболическую активность клеток ЛККЧ оценивали в НСТ-тесте по методу (Urbanitz D., 1975). Окислительно-восстановительную реакцию, т.е. внутриклеточную наработку $H_2O_2$ (одна из главных бактерицидных субстанций), определяли по количеству темно-синих гранул внутриклеточного диформазана в световом микроскопе ЛОМО; ок. х 10, об. х 40, 90 (масляная иммерсия) (Саркисов Д.С., 1996).

Критерием активности протеолитических ферментов ЛККЧ, участвующих в фагоцитозе, была концентрация клеток, в которых определяли неспецифическую эстеразу (НЭ) и кислую фосфатазу (КФ) по методу (Wachstein M.S., 1955). Об активности накопления в лизосомах КФ судили по количеству мелких гранул синего цвета, а НЭ – по количеству гранул темно-фиолетового цвета.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента с учетом коэффициента Фишера с применением компьютерной программы Excel. . Достоверность отличий оценивали с помощью t-критерия с уровнем значимости 5%.

***Результаты и обсуждение.*** После криоконсервирования количество клеток в ЛККЧ достоверно не изменилось в сравнении с незамороженными образцами. Сохранность клеток ЛККЧ, оцененная экспресс-методом суправитального окрашивания трипановым синим, составляла 98±0,9 и 84±5,1% до и после криоконсервирования соответственно. Данный метод позволяет лишь приблизительно оценить жизнеспособность клеток в суспензии, указывая на выраженность нарушений целостности плазматической мембраны клеток. Кроме того, трипановый синий обладает высо-ким сродством к растворенным белкам (например, к белкам сыворотки ККЧ), что может снижать точность оценки (Мороз Б.Б., 2001).

Более точную информацию о сохранности клеток кЛККЧ даёт метод исключения флуоресцентного красителя пропидиум йодида (PI), проникающего в клетку через повреждённую плазмолемму и связывающегося с ДНК (Lecoeur H., 2002). Соотношение PI-негативных (с интактной мембраной, которые не включают PI) и PI-позитивных клеток в образцах ЛККЧ после криоконсервирования было примерно 1:1. Следует отметить, что в показателях сохранности клеток кЛККЧ в образцах наблюдали большой разброс, что можно объяснить неоднородностью суспензии ЛККЧ, а также разной чувствительностью клеточных популяций ЛККЧ к физико-химическим факторам криоконсервирования (Плясунова С.А., 2006).

При анализе клеточного спектра свежевыделенного ЛККЧ до криоконсервирования было отмечено, что во всех исследуемых образцах преобладали гранулоциты. Моноциты и макрофаги составляли небольшой процент, определялись недифференцированные крупные клетки. После криоконсервирования в клеточной суспензии кЛККЧ преобладали лимфоциты. Наблюдали относительное снижение количества гранулоцитов и повышение макрофагов и недифференцированных клеток, появлялись фибробластоподобные клетки, отсутствовавшие до замораживания-отогрева. Такого рода перераспределение в клеточных популяциях в кЛККЧ можно объяснить их разной криочувствительностью.

При исследовании фенотипических характеристик ЛККЧ после криоконсервирования в общей суспензии отмечали относительное повышение количества $CD4^+$ и снижение $CD8^+$-клеток, а также рост содержания $CD56^+$-клеток на 24% по сравнению с незамороженными образцами, что свидетельствует об относительном повышении после замораживания-отогрева количества клеток, обладающих естественной киллерной активностью. Количество $CD34^+$-клеток в кЛККЧ достоверно не изменялось.

При исследовании функциональной активности клеток ЛККЧ после криоконсервирования отмечали снижение количества НСТ- и НЭ-положительных клеток в 2,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с исходными образцами; относительное же количество клеток, в лизосомах которых КФ положительно реагировала на субстрат, достоверно не изменялось.

Фагоцитарная активность моноцитов после криоконсервирования ЛККЧ снижалась и составляла: ФИ – 54 и ФЧ – 57% по сравнению с показателями нативных образцов. Интегральный показатель фагоцитарной активности (АПФА) снижался на 26%. При исследовании фагоцитарной активности макрофагов было отмечено, что хотя их количество после криоконсервирования и повысилось, что составило 150,5% от нативного контроля, их фагоцитарная активность снижалась: ФИ – на 12,3, ФЧ – на 12,5%. Однако АПФА макрофагов был выше, чем моноцитов и на 30% выше относительно нативного контроля.

Оценка популяционного состава ЛККЧ до и после замораживания-отогрева выявила различную степень криочувствительности клеточных субпопуляций в суспензии. После криоконсервирования ЛККЧ наблюдали достаточно высокую устойчивость к воздействию факторов криоконсервирования стволовых и ранних клеток-предшественников ($CD34^+$-клеток) (Цуцаева А. А., 2004, Цуцаева А. А., 2006). Полученные результаты подтверждаются и другими авторами (Райдан М., 2011), показавшими обратную зависимость между степенью дифференцировки клеток и их криоустойчивостью, что поясняют разным ядерно-цитоплазматическим соотношением, скоростью синтеза белков теплового шока, обратимостью или необратимостью денатурации внутриклеточных белков.

Сравнивая данные, полученные при морфологическом и иммунофенотипическом анализе клеточных популяций ЛККЧ, можно сказать, что морфологически одинаковые клетки несут на себе разные поверхностные маркеры, что подтверждает их различную классовую принадлежность и обусловливает различную функциональную активность.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что клеточные популяции ЛККЧ моноцитов и макрофагов в разной степени чувствительны к факторам криоконсервирования. После замораживания-оттаивания происходит модификация функциональной активности клеток ЛККЧ. Наблюдается относительное повышение содержания недифференцированных клеток и макрофагов за счет высокой криочувствительности гранулоцитов. Полученные результаты подтверждают возможность криоконсервирования модифицировать структурно-функциональные свойства замораживаемого биообъекта ранее продемонстрированную (Ketheesan N., 2004).

***Выводы***

1. После криоконсервирования по двухэтапной программе в растворе полиглюкина происходит перераспределение в клеточном составе ЛККЧ за счёт снижения содержания гранулоцитов, повышения недифференцированных клеток и макрофагов.
2. После криоконсервирования на фоне снижения общей бактерицидной активности (НСТ и НЭ) клеток ЛККЧ повышается фагоцитарная активность макрофагов.

**Литература**

1. Александров М.Г., Кудрявицкий А. И., Румянцева Е. Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лабораторное дело. 1988. №9. С. 30-32.

2. Бойко В.В., Грищенко В.И., Криворучко И.А. и др. Применение кордовой крови у больных с желудочными кровотечениями язвенного генеза // Укр. журнал малоінвазивної та ендоскопічної хірургії. 2001. № 5(1). С. 11-12.

3. Гольцев А.Н., Калиниченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. 1998. №1. С. 3-24.

4.Гольцев К.А., Криворучко И.А., Ачгибесов К.А. и др. Применение криоконсервированной кордовой крови в комплексной терапии острого гнойного перитонита у крыс // Медицина сегодня и завтра. 2011. №1-2 (50-51). С. 24-30.

5.Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Модификация состояния лимфогемопоэтического комплекса организма в условиях применения продуктов фетоплацентарного комплекса // Трансплантология. 2001. № 3. С. 5.

6.Лобынцева Г.С. Теоретические вопросы криоконсервирования стволовых клеток. Особенности работы криобанка пуповинной крови. // Трансплантология. 2007. Т.3, №1. С. 104.

7.Мороз Б.Б. Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции. Учебное пособие для студентов медицинских ВУЗов. М.:Медицина, 2001. 424 с.

8.Плясунова С.А. Клеточный состав пуповинной крови доношенных новорожденных: Автореф. дис… канд. мед. наук. М., 2006. 21 с.

9. Райдан М. Повышенная устойчивость недифференцированных и опухолевых клеток к повреждающему действию низких температур: Автореф. дис… канд. биол. наук. СПб, 2011. 26 с.

10. Саркисов Д.С., Перов Ю.А. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов. М.:Медицина, 1996. 543 с.

11. Цуцаева А. А., Грищенко В. И., Прокопюк О. С. и др. Безотмывочный метод криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека для клинического применения: Метод. Рекомендации. Харьков, 2000 20 с.

12. Цуцаева А. А., Глушко Т. О., Лобасенко Н. П. и др. Свойства криоконсервированных трансплантатов стволовых кроветворных клеток // Трансплантология. 2004. № 3. С. 374-377.

13. Цуцаева А. А., Цыганенко А.Я., Желтякова И.А. и др. Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на свойства ядерных компонентов и плазмы цельной кордовой крови человека // Проблемы криобиологии. 2006. Т. 16, № 1. С. 45-55.

14. Цуцаєва А.О., Грищенко В.І., Кудокоцева О.В. та ін. Патент №31847А, МПК A01N1/02. Україна. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові / Заявлено 05.11.1998; Опубл. 15.12.2000. Бюл. №7. С. 1-10.

15. Berz D., McCormack E.M., Winer E.S. et al. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells // American journal of hematology. 2007. Vol. 6, № 82. P. 463-472.

16.Ketheesan N., Whiteman C., Malczewski A.B. et al. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells // Transfus. Apher. Sci. 2004. Vol. 30, №1. P. 47 – 54.

17. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases // Exp. Cell Res. 2002. Vol. 277, № 1. P. 1-14.

18. Urbanitz D., Fechner T., Grob R. Nitroblau-tetrazolium (NBT) test bei isolierten menschlichen monozyten // Blut. 1975.Vol. 30, №3. P. 187-198.
19. Wachstein M.S. Histochemistry of leucocytes // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1955. Vol. 59, № 5. P. 1052-1065.

## ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕЙТРОФИЛОВ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

**Гулевский А.К., Ахатова Ю.С**.
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина*
E-mail: Julija_Veselovskaja@meta.ua

На сегодняшний день единственным способом, позволяющим в течение длительного периода сохранять лейкоконцентрат и, таким образом, создавать его запас, является криоконсервирование (Сведенцов Е.П. и др., 2005; Цуцаева А.А. и др., 1983). Однако качественные характеристики и клиническая эффективность лейкоконцентрата в процессе криоконсервирования существенно снижаются, что обусловлено влиянием многочисленных факторов, возникающих при замораживании-отогреве. В связи с этим для определения функциональной полноценности фагоцитов после криоконсервирования применяют ряд тестов, позволяющих оценить все основные этапы фагоцитарного процесса и выявить в них соответствующие нарушения.

Одним из важных аспектов оценки структурного состояния фагоцитирующих клеток после криоконсервирования может служить исследование их морфометрических параметров, таких как периметр, площадь, ядерно-цитоплазматическое отношение и компактность отдельных клеток. В то же время изучение изменения морфологии индивидуальных фагоцитирующих клеток после оттаивания представляет несомненный интерес, поскольку позволяет судить не только и не столько о количестве клеток, вступивших в реакцию фагоцитоза, и о количестве поглощенных ими частиц, но и о качестве протекания процесса. В связи с этим целью настоящей работы было исследовать морфометрические характеристики нейтрофилов, криоконсервированных в составе лейкоконцентрата под защитой 5% диметилацетамида.

**Материалы и методы.** *Объект исследования*. В работе использовали лейкоконцентрат, полученный из донорской крови человека методом седиментации эритроцитов декстраном (Гришина В.В., 2004). Постановку реакции фагоцитоза проводили стандартным клиническим методом

(Подопригора Г.И., 1976). В качестве объекта фагоцитоза использовали инактивированную суточную культуру Staphylococcus aureus штамм № 209. Мазки выполняли в технике «обратная капля» и фиксировали раствором эозин-метиленовым синим (по Май-Грюнвальду), окрашивали раствором азур-эозина (по Романовскому). Окрашенные мазки анализировали с помощью светового микроскопа PZO-Warszava (Польша) под иммерсией (ок.8, об. 90). Измерение размеров нейтрофилов, площади цитоплазмы и ядра в них проводилось методом компьютерной цитоморфометрии в программе Zeiss LSM Image Examiner Version 4.2.0.121, при этом измерения проводили не менее чем для 300 клеток каждого из доноров (n=3).

*Криоконсервирование лейкоконцентрата*. Лейкоконцентрат криоконсервировали в среде, содержащей 5% диметилацетамида (ДМАц) и 5% глюкозы, в режиме медленного охлаждения (Аграненко В.А. и др., 1986). Клеточную суспензию с концентрацией лейкоцитов $2\times10^7$ клеток/мл и объемом 0,5 мл охлаждали с помощью программного замораживателя ЗП 10 (СКТБ ОП ИПКиК НАНУ) по 3 этапной программе: I этап – охлаждение образцов лейкоконцентрата со скоростью 3 град/мин до температуры кристаллизации; II этап – время фазового перехода с остановкой процесса на 3-4 мин; III этап – дальнейшее охлаждение со скоростью 5 град/мин до –100°С, после чего контейнеры с клетками помещали в жидкий азот (-196°С) (Аграненко В.А. и др., 1986). Отогрев суспензии проводили на водяной бане при 38°С.

**Результаты и обсуждение.** Исследование морфологических параметров активированных стафилококком нейтрофилов, криоконсервированных в составе лейкоконцентрата под защитой 5% ДМАц, свидетельствует о том, что после криоконсервирования происходит уменьшение линейных размеров фагоцитов. Как видно из таблицы, периметр деконсервированных клеток достоверно снижается по сравнению с нативным контролем, кроме того, площадь клеток достоверно уменьшается в среднем на 27,7 %. Так как периметр фагоцитирующей клетки в первую очередь связан с количеством и размером псевдоподий, образующихся при хемотаксисе и на этапе поглощения микробных тел, полученные результаты, по-видимому, свидетельствуют о том, что процесс криоконсервирования, хранения и оттаивания нейтрофилов приводит к необратимому снижению их подвижности.

При исследовании периметра ядер нативных и деконсервированных нейтрофилов наблюдались сходные изменения: периметр ядер деконсервированных нейтрофилов достоверно уменьшался в среднем на 23,6 %. Однако площадь ядер клеток после криоконсервирования оставалась на уровне контрольных значений, что, по-видимому, свидетельствует об изменении формы ядер от сегментированной к более сферической.

Совершенно иная картина наблюдалась при исследовании площади цитоплазмы нейтрофилов. Из таблицы видно, что площадь цитоплазмы в исследуемых клетках после криоконсервирования достоверно уменьшается. В среднем площадь цитоплазмы криоконсервированных нейтрофилов уменьшается на 43,7% по сравнению с контролем и на 37,4 % по сравнению с контролем в присутствии 5% ДМАц в среде инкубации, при этом добавление ДМАц в суспензию свежевыделенных лейкоцитов не приводит к достоверному изменению данного показателя. Для фагоцитирующих клеток уменьшение площади цитоплазмы имеет особое значение, так как большинство этапов фагоцитарного акта в той или иной степени связаны с процессами, происходящими в цитоплазме клеток, например, с функционированием двигательного аппарата фагоцитов, образованием фагосом и фаголизосом, направленной мобилизацией гранул с лизосомальными ферментами и дегрануляцией, а также с функционированием широкого спектра цитоплазматических ферментов (Пинегин Б.В., Маянский А.Н., 2007). По всей видимости, наблюдаемое уменьшение количества цитоплазмы связано с явлением дегидратации, имеющей место при криоконсервировании клеточных суспензий и обусловленной ростом внеклеточных кристаллов льда и действием экзогенных растворов солей, особенно в режиме медленного охлаждения, а также необратимым изменением ее физико-химического состояния, приводящим к частичной потере способности к регидратации на этапе отогрева. Не исключено также значение происходящей при этом трансформации цитоскелета фагоцитов.

На основании этих данных можно сделать вывод о том, что уменьшение общей площади нейтрофилов происходит именно за счет сокращения площади цитоплазмы. Для фагоцитирующих клеток это имеет особое значение, так как большинство этапов фагоцитарного акта в той или иной степени связаны с процессами, происходящими в цитоплазме клеток (Маянский А.Н., 1983).

Важной морфологической характеристикой, позволяющей оценить уровень метаболизма клетки и отражающей возможность и активность фагоцитоза нейтрофилами, является ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), представляющее собой отношение площадей ядер клеток к площадям их цитоплазмы. Для зрелых нейтрофилов периферической крови человека ядерно-цитоплазматическое отношение сдвинуто в пользу цитоплазмы (т.е. меньше 0,5 отн. ед.) (Луговская С.А., 2004). В наших исследованиях ЯЦО для свежевыделенных нейтрофилов составило 0,43 ± 0,009 отн. ед., однако для деконсервированных нейтрофилов ЯЦО достоверно увеличивалось в пользу ядра и составляло 0,54 ± 0,01 отн. ед., что также свидетельствует о значительном уменьшении количества цитоплазмы в клетках.

Таблица.

Морфометрические показатели нейтрофилов лейкоконцентрата после криоконсервирования под защитой 5% ДМАЦ

| Показатель | До криоконсервирования | | После криоконсервирования |
|---|---|---|---|
| | Свежевыделенные клетки | Свежевыделенные клетки в присутствии 5 % ДМАц | |
| Периметр клетки, мкм | 42,05 ± 2,58 | 39,12 ± 0,1 | 33,98 ± 0,6 * |
| Периметр ядра, мкм | 34,92 ± 2,3 | 30,01 ± 0,33 | 26,69 ± 1,0 * |
| Площадь клетки, мкм$^2$ | 120,05 ± 7,4 | 105,78 ± 2,08 | 86,83 ± 3,6 * |
| Площадь ядра, мкм$^2$ | 50,45 ± 2,9 | 42,95 ± 0,89 | 47,5 ± 3,2 |
| Площадь цитоплазмы, мкм$^2$ | 69,6 ± 4,5 | 62,84 ± 0,32 | 39,33 ± 0,48 * ** |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение, отн. ед. | 0,43 ± 0,009 | 0,41 ± ,0,005 | 0,54 ± 0,01 * ** |
| Компактность клетки, отн. ед. | 1,17 ± 0,06 | 1,15 ± 0,02 | 0,98 ± 0,06 |

*Примечания*: * - отличия достоверны по сравнению с контролем до криоконсервирования ($p<0,05$). ** - отличия достоверны по сравнению с контролем до криоконсервирования в присутствии 5% ДМАц ($p<0,05$)

Для характеристики компактности (С) нейтрофилов были использованы расчеты, предложенные в работе (Герасимов И.Г. и др., 2009). Величина компактности отражает степень приближения периметра клетки к окружности или площади – к кругу: при приближении формы клетки к округлой С ! 1. Как видно из таблицы, форма нативных нейтрофилов несколько удалена от округлой, в то время как деконсервированные клетки имеют практически сферическую форму. Полученные данные свидетельствуют о том, что свежевыделенные клетки более пластичны и в большей степени способны изменять свою форму путем формирования псевдоподий, при этом добавление криопротектора (ДМАц в конечной концентрации 5%) в клеточную суспензию не влияло на величину компактности.

Таким образом, исследование морфологии нейтрофилов лейкоконцентрата свидетельствует о том, что исходно, не зависимо от присутствия в среде инкубации ДМАц, клетки не различались по значениям таких морфометрических показателей, как периметр клеток и их ядер, площадь клеток, площадь цитоплазмы и ядер, а также ядерно-цитоплазматическое отношение и компактность. Показано, что после криоконсервирования под защитой 5 % ДМАц имеет место достоверное уменьшение основных морфометрических характеристик нейтрофилов, включая периметры клетки и ядра, общую площадь и площадь цитоплазмы, а также изменение ЯЦО в пользу ядра.

**Литература**

1. Аграненко В.А., Абергауз Н.Н., Трошина В.М. и др. Криоконсервирование гранулоцитов с раствором «Лейкокриодмац» // Гематология и трансфузиология. 1986. Т. XXXI, №12. С. 26-29.

2. Герасимов И.Г., Гальбурт Т.М. Морфология нейтрофилов крови человека в процессе их фагоцитоза in vitro//Вестник Донецкого национального университета. 2009. №1. С. 377-382

3. Гришина В.В., Тимохина Е.В., Андреева Л.Ю. Система сбора и фракционирования стволовых клеток пуповинной крови // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2004.Т.3, №6. С. 50-54.

4. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. Триада. 2004. 242 с.

5. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.Новосибирск: Наука.1983. 255 с.

6. Пинегин Б.В., Маянский Н.А. Нейтрофилы: структура и функция. //Иммунология 2007. №6. С. 374-382.

7. Подопригора Г. И., Андреев В. Н. Современные методы изучения фагоцитарной активности лейкоцитов in vitro // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1976. № 1. С. 19–25.

8. Сведенцов Е.П., Щеглова О.О., Туманова Т.В. и др. Сохранность лейкоцитов в условиях криоанабиоза (-40°С) // J. of stress physiol. & Biochemistry. 2005. Т. 1, №4. Р. 29-34

9. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. Криоконсервирование клеточных суспензий. Киев: Наук.думка. 1983. 240 с.

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ (ДО 5 КДА) КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

**Гулевский А.К., Горина О.Л., Сейдалиева З.А., Моисеева Н.Н.**

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

E-mail: moiseeva-nataly@rambler.ru

В настоящее время в клинической практике для восстановления нарушенных функций иммунной системы активно применяют препараты природного происхождения (Хаитов Р. М., 2000). Представляет интерес исследование такого известного биогенного стимулятора как кордовая кровь. В клинической практике подтверждена эффективность применения клеточных элементов, плазмы, сыворотки и отдельных высокомолекулярных веществ кордовой крови (Гольцев А.Н., 1998; Морозова Р.П., 1999). Однако исследования биологической активности низкомолекулярных составляющих кордовой крови единичны. Кроме того, актуальным остается вопрос сохранения биологической активности компонентов препаратов на разных этапах производства готового лекарственного продукта.

**Целью нашей** работы было исследование влияния низкотемпературного хранения на динамику изменения биологической активности низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции кордовой крови человека (ФККЧ) в отношении фагоцитарной активности лейкоцитов донорской крови человека в экспериментах *in vitro*.

**Материалы и методы.** Выделение фракции с компонентами молекулярной массой до 5 кДа из цельной кордовой крови человека (ФККЧ), подвергнутой криодеструкции, проводили методом ультрафильтрации (Брок Т. Д., 1987) с использованием мембранного модуля фирмы "Sartorius" (Германия). После ультрафильтрации ФККЧ лиофилизировали и затем хранили при -80°С и при -196°С в течение 12 месяцев.

Концентрат лейкоцитов получали методом дифференциального центрифугирования цельной донорской крови человека, заготовленной на консерванте "Глюгицир" (Аграненко В. А., 1985). Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов проводили по методу (Подопригора Г. И., 1976; Розанова О. Е., 1989). В качестве объекта фагоцитоза использовали инактивированную суточную культуру *Staphylococcus aureus* штамм № 209. Фагоцитарную суспензию инкубировали при температуре 37°С в течение 45 и 120 мин. Определяли процент фагоцитирующих нейтрофилов – фагоцитарный индекс (ФИ) и среднее количество микробных тел на один нейтрофил – фагоцитарное число (ФЧ) после 45 и 120 мин инкубации, а также индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) – отношение фагоцитарного числа после 45 мин инкубации к фагоцитарному числу через 120 мин инкубации, характеризующее переваривающую активность нейтрофилов. Для исследования влияния ФККЧ на функциональную активность нейтрофилов низкомолекулярную фракцию кордовой крови вносили в суспензию лейкоцитов перед добавлением стафилококка до конечной концентрации 0,15 мг/мл.

**Результаты и обсуждение.** Ранее в работах (Gulevsky A. K., 2011; Горина О.Л., 2011) было показано, что низкомолекулярная (до 5 кДа) фракция кордовой крови крупного рогатого скота оказывает достоверное стимулирующее влияние на фагоцитирующие клетки донорской крови человека в экспериментах *in vitro*. При этом исследование фагоцитарной способности нейтрофилов под влиянием фракции является достаточно эффективным тестом для анализа её биологической активности. В связи с этим данный тест был взят за основу для определения биологической активности низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции кордовой крови человека (ФККЧ) после хранения в течение 12 месяцев при низких температурах ( -80°C и -196°C).

Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что ФККЧ, не подвергавшаяся хранению, достоверно не влияла на показатель фагоцитарного индекса нейтрофилов, характеризующего количество активированных клеток в присутствии объекта фагоцитоза. Дальнейшее хранение низкомолекулярной фракции в течение 12 месяцев как при -80°C, так и при -196°C достоверно не оказывало влияния на биологическую активность низкомолекулярной фракции в отношении изучаемого показателя.

Таблица 1.

Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови человека после разных режимов хранения на количество фагоцитирующих нейтрофилов концентрата лейкоцитов донорской крови

| Условия хранения ФККЧ | | Фагоцитарный индекс, % | |
|---|---|---|---|
| | | 45 минут инкубации, 37°C | 120 минут инкубации, 37°C |
| Натив | контроль | 63,29±1,30 | 64,16±0,46 |
| | ФККЧ | 64,42±1,74 | 65,04±1,02 |
| 6 месяцев хранения | контроль | 63,07±2,15 | 65,98±2,35 |
| | ФККЧ, при температуре -80° | 64,52±1,36 | 64,86±2,02 |
| | ФККЧ, при температуре -196°C | 65,27±2,13 | 62,96±1,93 |
| 12 месяцев хранения | контроль | 63,16±1,88 | 63,53±1,94 |
| | ФККЧ, при температуре -80°C | 63,74±1,55 | 64,17±1,95 |
| | ФККЧ, при температуре -196°C | 64,23±2,03 | 64,73±1,42 |

Поглощение объекта фагоцитоза (стафилококка) нейтрофилами является не менее важным этапом фагоцитарной реакции, чем распознавание и рецепция внешнего сигнала плазматической мембраной клетки при появлении стафилококка (Дунина-Барковская А. Я., 2004). Поэтому помимо показателя ФИ, характеризующего количество активированных нейтрофилов, исследовали показатели поглотительной и переваривающей способности фагоцитирующих клеток – ФЧ и ИЗФ соответственно. Результаты наших исследований показали, что ФККЧ оказывала влияние на поглощение стафилококков нейтрофилами. Из рис. 1А видно, что после инкубации лейкоконцентрата в течение 45 минут с ФККЧ показатель ФЧ клеток достоверно повышался в 1,32 раза в сравнении с контролем. После 120 минут инкубации с низкомолекулярной фракцией, значения данного показателя существенно уменьшились. При этом ФЧ оставалось на уровне контрольных значений в данном временном интервале.

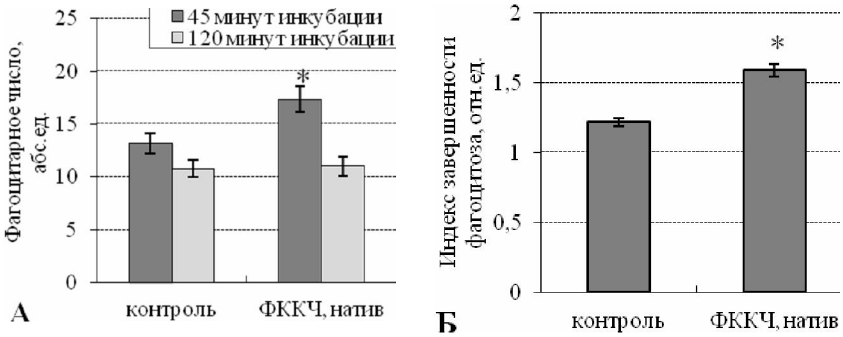
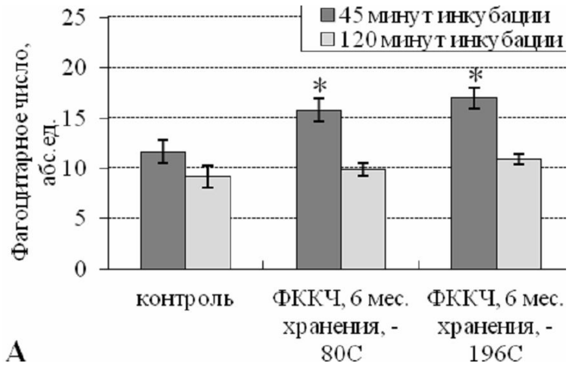



Рис.1. Влияние ФККЧ на поглотительную (А) и переваривающую (Б) активность нейтрофилов концентрата лейкоцитов из донорской крови; n=5

*Примечания*: * - отличия достоверны в сравнении с контролем после 45 минут инкубации (p<0,05); ** - отличия достоверны в сравнении с контролем (p<0,05).

Подобная динамика снижения показателя через 2 часа инкубации может свидетельствовать об усилении процессов переваривания микробных тел в фагоцитах, что подтверждается вычислением индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Данный показатель характеризует переваривающую активность клеток и отражает отношение среднего числа фагоцитированных микробных тел к среднему числу неразрушенных микробных тел. Завершенным считается фагоцитоз при индексе более 1 (Розанова О. Е., 1989). Полученные результаты представлены на рис. 1Б. Добавление в среду инкубации ФККЧ приводило к достоверному увеличению переваривающей способности нейтрофилов. Так, после инкубации с низкомолекулярной фракцией кордовой крови человека ИЗФ фагоцитирующих клеток повышался до 1,59±0,043 отн.ед. в то время как контрольное значение было на уровне 1,22±0,028 отн.ед.

После хранения ФККЧ в лиофилизированном состоянии в течение 6 месяцев при температурах -80°С и -196°С наблюдалось подобное стимулирующее действие фракции в отношении поглотительной и переваривающей активности нейтрофилов донорской крови (рис.2А и рис. 2Б). Показатели ФЧ через 45 минут инкубации лейкоконцентрата с ФККЧ, хранившейся при -80°С и -196°С, были достоверно ($p<0,05$) в 1,36 и 1,46 раз соответственно выше по сравнению с контролем.



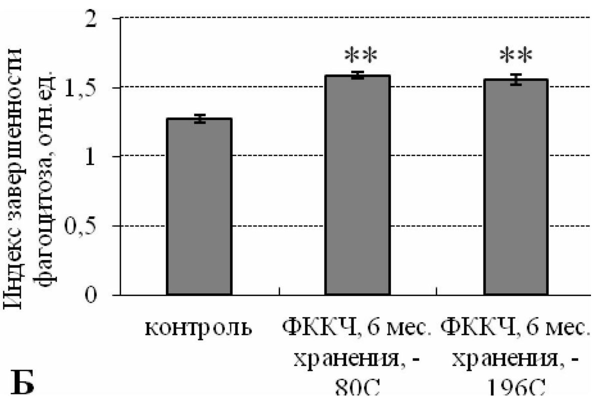
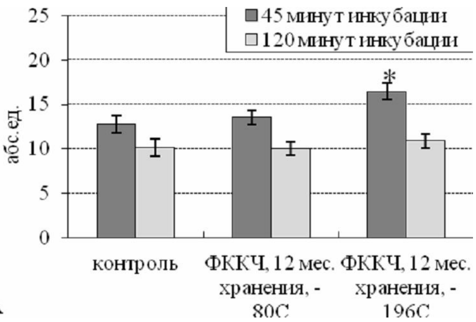




Рис.2. Влияние ФККЧ после 6 месяцев хранения на поглотительную (А) и переваривающую (Б) активность нейтрофилов концентрата лейкоцитов из донорской крови; n=5

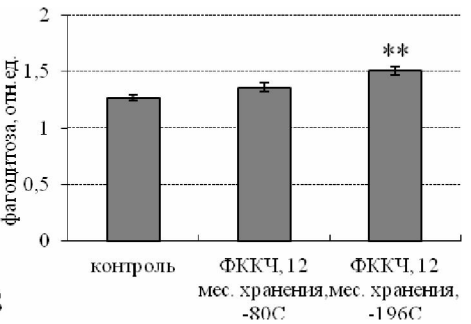
*Примечания*: * - отличия достоверны в сравнении с контролем после 45 минут инкубации ($p<0,05$); ** - отличия достоверны в сравнении с контролем ($p<0,05$).

Исследование показателя ИЗФ фагоцитирующих клеток показало, что низкомолекулярная фракция независимо от температуры хранения в течение 6 месяцев сохраняет биологическую активность на уровне значений нативной ФККЧ. Переваривающая активность нейтрофилов после инкубации концентрата лейкоцитов в присутствии ФККЧ, хранившейся при -80°С, по сравнению с контролем увеличивалась в 1,25 раз (рис. 2Б). В случае инкубации клеток с ФККЧ после хранения при -196°С показатель ИЗФ также повышался в 1,23 раза, что достоверно не отличалось от результатов, полученных при оценке переваривающей способности нейтрофилов, инкубированных с ФККЧ, не подвергавшейся низкотемпературному хранению (рис. 1Б).

Анализ фагоцитарной активности нейтрофилов, инкубированных с низкомолекулярной фракцией кордовой крови, хранившейся на протяжении 12 месяцев в выбранных температурных режимах, показал следующие результаты (рис. 3А и рис. 3Б). Хранение 12 месяцев ФККЧ в лиофилизированном состоянии при температуре -80°С приводит к снижению ее биологической активности в отношении фагоцитарной активности нейтрофилов. Так, установлено достоверное снижение показателей ФЧ и ИЗФ клеток после инкубации с ФККЧ по сравнению с аналогичными показателями нейтрофилов, инкубированных с ФККЧ через 6 месяцев хранения и нативной ФККЧ.




А




Б

Рис. 3. Влияние ФККЧ после 12 месяцев хранения на поглотительную (А) и переваривающую (Б) активность нейтрофилов концентрата лейкоцитов из донорской крови; n=5.

*Примечания*: * - отличия достоверны в сравнении с контролем и ФККЧ, хранившейся при -80°С, после 45 минут инкубации ($p<0,05$); ** - отличия достоверны в сравнении с контролем ($p<0,05$).

Установлено, что ФЧ нейтрофилов после 45 минут инкубации в присутствии ФККЧ, хранившейся 12 месяцев при -80°С, был достоверно снижен на 17,81% по сравнению с аналогичным показателем для ФККЧ, хранившейся при -196°С. Поглотительная активность клеток, инкубированных с ФККЧ после хранения при -196°С, была на уровне активности нейтрофилов после инкубации с нативной ФККЧ. Показатель

ИЗФ после инкубации с ФККЧ (-80°С) был на 9,93% ниже значений после инкубации клеток с ФККЧ, хранившейся при -196°С (рис. 3Б).

Таким образом, полученные результаты позволили установить, что низкомолекулярная (до 5 кДа) фракция кордовой крови человека оказывает стимулирующий эффект на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов, а именно на поглотительную и переваривающую способности. Проведенные исследования по изучению влияния низкотемпературного хранения на динамику изменения биологической активности (ФККЧ) в отношении фагоцитарной активности лейкоцитов донорской крови человека в экспериментах *in vitro* показали, что более длительное сохранение её биологической активности на уровне свежевыделенной фракции без внесения дополнительных консервантов и стабилизаторов, возможно при температуре -196°С.

**Литература**

1. Аграненко В. А., Сукясян Г. В., Воробьева Г. С. и др. Методы выделения концентратов тромбо- и лейкоцитов из лейко-тромбоцитарного слоя консервированной крови в пластикатных мешках // Гематология и трансфузиология. 1985. Т. 30, № 11. С. 54–59.
2. Брок Т. Д. Мембранная фильтрация / Т. Д. Брок; [пер. с англ. С. М. Зеньковского, М. Л. Шульмана; под ред. Б. В. Мчедлишвили]. Москва: Мир, 1987. 464 с.
3. Гольцев А. Н., Калиниченко Т.А. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть 2. Иммунологическая характеристика // Проблемы криобиологии. 1998. Т. 8, № 1. С. 3–24.
4. Горіна О.Л. Реабілітація кріоконсервованих лейкоцитів в середовищі, що містить низькомолекулярну фракцію кордової крові: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.19. “Кріобіологія” / О.Л. Горіна. Харків, 2011. 20 с.
5. Дунина-Барковская А. Я. Фагоцитоз – три в одном: адгезия, эндоцитоз и экзоцитоз // Биологические мембраны. 2004. Т. 21, № 4. С. 243-270.
6. Морозова Р. П., Козулина Е. П., Николенко И. А. и др. Плацента – источник биологически активных веществ // Укр. біохім. журнал. 1999. Т. 71, № 4. С. 21–29.
7. Подопригора Г. И., Андреев В.Н. Современные методы изучения фагоцитарной активности лейкоцитов in vitro // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1976. № 1. С. 19-25.

8. Розанова О. Е., Серова Л.Д., Шабалин В.Н. Влияние цитостатических и гормональных препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов больных лейкозом // Гематология и трансфузиология. 1989. Т. 34, № 4. С. 15-20.

9. Хаитов Р. М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. 2000. № 5. С. 4-7.

10. Gulevsky A. K., Moiseyeva N. N., Gorina O. L. Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils // CryoLetters. 2011.V. 32, № 2. P.131-140.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ ПО ДАННЫМ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

**Дёмин Ю.А., Пивненко А.В., Малова Н.Г. *, Дёмина М.Ю.**

*Харьковская медицинская академия последипломного образования, Харьков , Украина*

**Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины*

E-mail: girsh@ukr.net

Введение: В настоящее время активно проводятся исследования, посвященные изучению механихзмов действия криоконсервированных клеточных препаратов в офтальмологии. Суть метода тканевой и клеточной терапии заключается в активации компенсаторных ресурсов поврежденных клеток и тканей реципиента, стимуляции репаративной регенерации в этих тканях.

Цель: морфологическое изучение роговицы с экспериментальной дистрофией при различных методах введения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток (кМСК).

Материалы и методы: экспериментальные исследования были выполнены на 10 кроликах (20 глаз) породы Шиншилла весом 2.5-3.0 кг. Экспериментальная дистрофия роговицы была выполненна по методике с использованием Митомицина-С. Введение кМСК произведено методом гидрирования роговицы и путем аппликации клеточного биологического покрытия (КБП) (кМСК на внутренней поверхности мягкой контактной линзы). Морфологические исследования проводились на фрагментах роговицы энуклеированных глаз экспериментальных животных. Были изготовлены гистологические срезы толщиной 4-5 ммк, которые окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Выполнена микрофотосъемка полученных препаратов.

Результаты. У кроликов, которым была проведена деэпителизация роговицы, непосредственно после воздействия наблюдается полное отсутствие эпителиального слоя, в результате чего строма роговицы выглядит оголенной. (рис 1.)

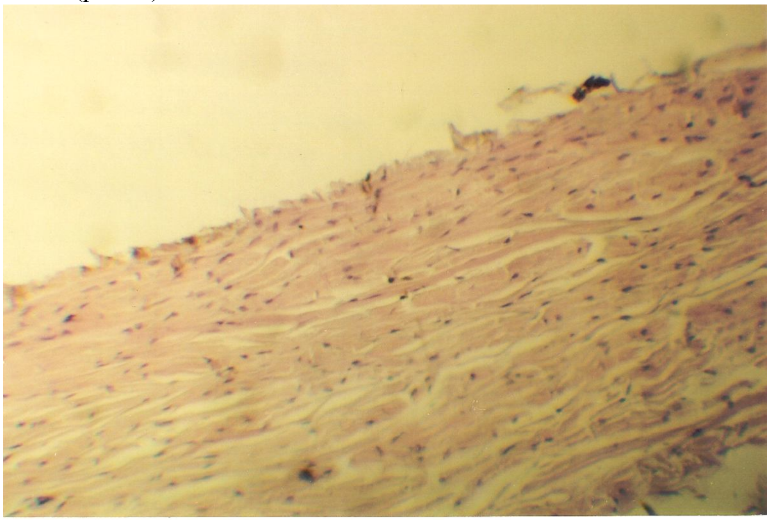


Рис. 1. Гистологический препарат роговицы кролика непосредственно после химической деэпителизации. Эпителиальный слой отсутствует, отек стромы, увеличенное количество фибробластов.

Окраска гематоксилин-эозином, х 150

У животных контрольной группы через 7 суток после химической деэпителизации наблюдаются такие признаки воспаления роговицы, как отек стромы и лимфоидная инфильтрация, сопровождающиеся появлением в строме роговицы мелких кровеносных сосудов капиллярного типа (рис. 2).

Результаты исследования в опытных группах с применением гидририрования и КБП свидетельствуют о том, что на 7 сутки в обоих группах отмечалось активное размножения клеток эпителия роговицы, кроме того определялись инфильтрация и отек стромы. Однако все эти явления были менее выражены по сравнению с контрольной группой (рис. 3 и рис. 4)

Как показывает данный опыт, более эффективным методом восстановления роговой оболочки с моделированной дистрофией является гидрирование зоны лимба с применением кМСК (рис. 3). Способ применения КБП имеет сходный эффект (рис.4), однако эпителизация происходит менее равномерно и чуть в более поздние сроки.

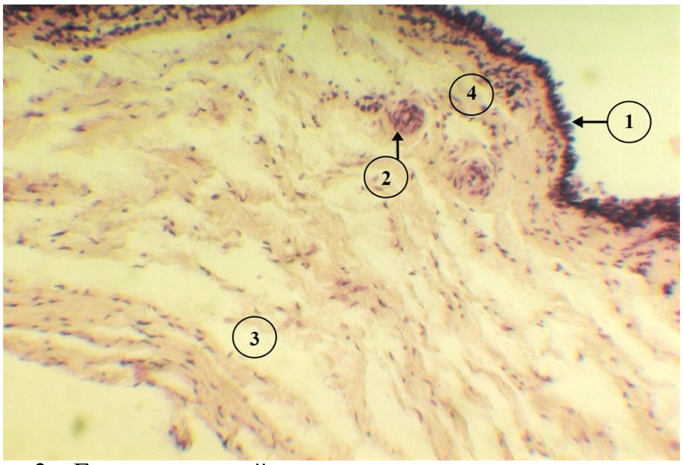



Рис. 2. Гистологический препарат роговицы кролика контрольной группы на 7 сутки после химической деэпителизации. 1 – эпителиальный слой в центральной части роговицы со сниженной вертикальной анизоморфией; 2 – капилляры в строме роговицы; 3 – отек стромы роговицы.

Окраска гематоксилин-эозином, х 150.

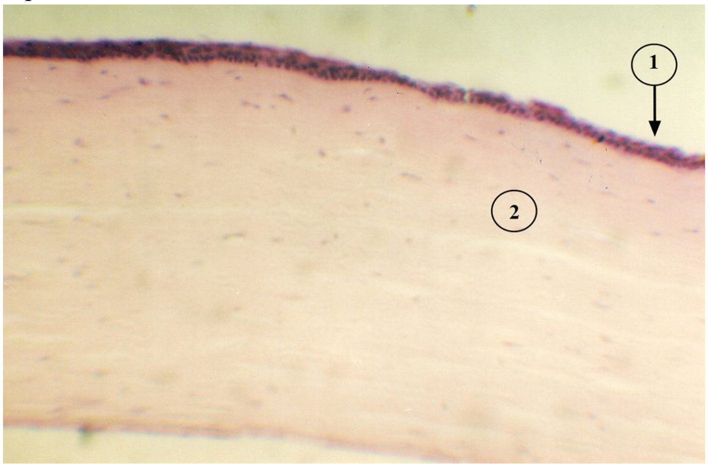



Рис. 3. Гистологический препарат роговицы кролика опытной группы на 7-е сутки после химической деэпителизации с применением гидрирования 1 – эпителиальный слой; 2 – строма.

Окраска гематоксилин-эозином, х 150

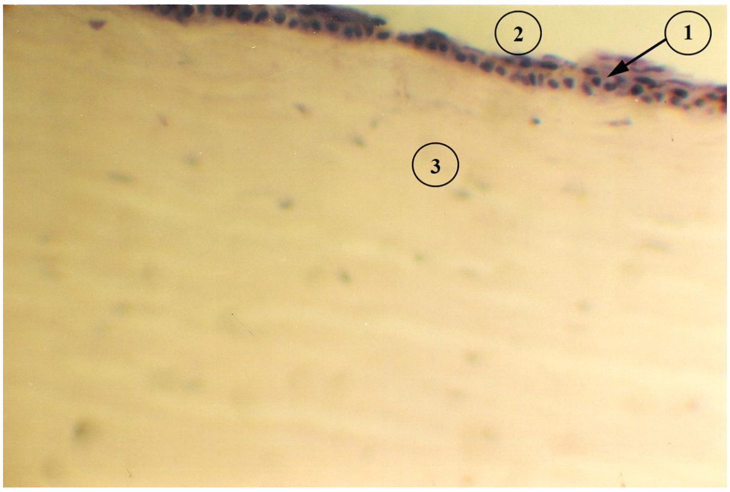



Рис. 4. Гистологический препарат роговицы кролика опытной группы на 7-е сутки после химической деэпителизации с применением КБП 1 – участок избыточной пролиферации эпителия; 2 – участок сниженной пролиферации эпителия; 3 – строма.

Окраска гематоксилин-эозином, х 300

Выводы: применение метода гидрирования при экспериментальной дистрофии роговицы является эффективным методом нормализации структуры роговицы. При использовании метода КБПтакже восстанавливается морфологическая структура роговицы. Однако отмечается разная толщина эпителиального слоя, клеточные слои слабо соединены между собой, отмечаются отдельные участки десквамации эпителия роговой оболочки.

Следовательно, при экспериментальной дистрофии роговицы метод гидрирования кМСК более эффективен по сравнению с методом КБП.

## КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ПОСТОЯННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РЫБ

**Завьялова Е.А., Богданова П.Д.**
*ГНУ ВИЭВ им.Я.Р.Коваленко Россельхозакадемии, Москва, Россия*
E-mail: aquazeda@mail.ru

**Введение.** К настоящему времени из тканей различных видов рыб получено более 450 перевиваемых клеточных линий. Многие из них происходят из эмбриональных тканей и потому обладают хорошим потенциалом удвоения. Другие линии клеток могут размножаться неограниченно за счет того, что они возникают благодаря изменениям в первичной клеточной продукции, либо потому, что они исходно приготовлены из опухолевых тканей. И линии клеток с ограниченным потенциалом размножения, и постоянные линии, могут быть размножены и затем охарактеризованы для широкого использования в научных исследованиях (Завьялова Е.А., 2009, http:/ www.atcc.org/; http:/ www.hpacultures.org.uk/).

Преимущества работы с хорошо изученными линиями клеток, не контаминированными микроорганизмами, представляются бесспорными. К сожалению, приходится постоянно иметь дело с трудностями, связанными с использованием клеточных линий. Известны многочисленные случаи, когда обмен клеточными линиями между разными лабораториями приводил к загрязнению клеток клетками других линий, потери времени и ресурсов, вытекающие из этой проблемы, огромны (Freshney R.I., 1989; Кулешов К.В., 2009). Бактериальные и грибковые загрязнения представляют дополнительные трудности, но в большинстве случаев они ярко проявляются и легко выявляются и, следовательно, приводят к менее серьезным последствиям, чем более незаметное заражение микоплазмой. Тем не менее, сложность выявления этих микроорганизмов и преобладание зараженных культур среди объектов исследований показывают важность этой проблемы (Чернов В.М., 1996).

Широкое внедрение метода культур клеток в вирусологию для репродукции вирусов или при изготовлении иммунобиологических компонентов диагностических препаратов требует разработки вопросов длительного сохранения клеточных линий и штаммов, по возможности не наращивая число пассажей и сохраняя их первоначальные свойства

Линии клеток рыб, представляющие интерес для диагностической работы, полученные из нескольких научных институтов, а также приготовленные сотрудниками лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ изучены, охарактеризованы, депонированы в Специализированной Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК(П) (СХЖ РАСХН) при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко (ВИЭВ Россельхозакадемии) и заложены в криобанк. В ходе проведения этой работы были апробированы различные концентрации криопротекторов и отработаны методы, позволяющие получать высокий процент жизнеспособных клеток после оттаивания, не снижающийся в процессе хранения более 8 лет (срока наблюдения).

Повреждения клеток, происходящие при замораживании и оттаивании культуры, обусловлены внутриклеточными кристаллами льда и осмотическими эффектами. Добавление криопротекторов, таких как диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин, а также оптимальная скорость замораживания и оттаивания сводят повреждения клеток к минимуму. Возможно кратковременное сохранение замороженных клеток в шкафу глубокого охлаждения (-75°С), но значительно лучше хранить клетки в жидком азоте (-196°С), либо в его парах (-120°С). Метод замораживания в жидком азоте предпочтительнее не только из-за более низкой температуры и, следовательно, почти неограниченного срока хранения, но и вследствие полного отсутствия риска механического повреждения клеток (Muldrew K, 1999). Хранение ампул в жидком азоте со всей очевидностью необходимо при создании любых банков клеток, за исключением самых маленьких (Wolfw J., 2004).

**Перевиваемые культуры клеток рыб.** EPC - культура эпителиальной папилломы карпов (ECACC №93120820); FHM – хвостовой стебель гольяна (ATCC CCL 42); CHH-1 – сердце кеты (ECACC №92110412); CHSE-214 - эмбрион чавычи (ATCC CRL 1681), RTG-2 – гонады радужной форели (ATCC CCL 55), OMG гонады радужной форели (Патент РФ №2495120), STLE – эмбрион кумжи (Завьялова Е.А., 2013), WSSK-1 – кожа белого осетра (Hedrick R.P., 1991), SSF-1, 2, 3 – плавник сибирского осетра (субштаммы) (патент РФ №2488632).

**Необходимые реактивы и оборудование.** Питательные среды, для культивирования клеток – ИГЛА МЕМ, ИГЛА МЕМ с двойным набором аминокислот (ПанЭко, Москва, Россия); фетальная телячья сыворотка (HyClone, Thermo scientific, UK); 0,02% раствор версена (ЭДТА) (ПанЭко, Москва, Россия); 0,25% раствор трипсина(ПанЭко, Москва, Россия); раствор Хенкса (ПанЭко, Москва, Россия); 0,05% раствор трипанового синего (Лабораторная техника, Москва, Россия); ДМСО (диметилсульфоксид) (ПанЭко, Москва, Россия); центрифужные пробирки (SPL, Корея); пипетки от 0,1 до 10 мл; культуральные флаконы 25,50,75,100 см2 (SPL, Корея); криопробирки объемом 1,2 мл с внутренней резьбой, круглодонные (TPP, Швейцария); камера Горяева; коробка из пенопласта (толщина стенок около 2 см); ламинарный шкаф (ESCO, США), центрифуга 1000-3000 об/мин с охлаждением и без; световой микроскоп (ув. х70, х280); термостаты на 15 и 20 °С; холодильник бытовой и низкотемпературный (-70°С); сосуд Дьюара; жидкий азот.

**Среды для заморозки культур клеток рыб.** В таблице 1 приведены прописи сред для заморозки, разработанные разными авторами и использованные для культур клеток рыбного происхождения в лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ.

Таблица 1.

Среды для криоконсервации перевиваемых клеток рыб

| № методики | Среда | Фетальная сыворотка | ДМСО | Источник |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 75% | 15% | 10% | Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В., Москва, 2008 |
| 2 | 60% | 30% | 10% | Heidrun L Wergeland, 2001 |
| 3 | 80% | 10% | 10% | R.P.Hedrick; S.McDowell; C.N. Lannan, 1991 |

**Принцип работы.** Непосредственно перед работой подготавливали среду для заморозки путем простого смешивания свежей ростовой среды с криопротектором согласно приведенных выше прописей. Для криоконсервации отбирали культуры на поздней логарифмической или предконфлюентной фазах роста, поскольку именно такие культуры наиболее жизнеспособны, их просматривали при малом увеличении светового микроскопа (ув.7х10). Из матрасов удаляли ростовую среду, монослой промывали раствором Хенкса комнатной температуры и вносили смесь растворов версена (0.02%) и трипсина (0,25%) в соотношении привычном для данной культуры и оставляли на 5-10 минут время от времени покачивая. Как только клетки под воздействием диспергента «набухали» и небольшое их количество начало отделяться от стекла, матрасы переворачивали стороной с монослоем вверх, и осторожно сливали раствор. Для инактивации ферментов в матрасы добавляли небольшое количество фетальной телячьей сыворотки и энергично встряхивали, брали пробу для подсчета общего количества клеток. Клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. и ресуспендировали осадок в нужном объеме среды для заморозки при комнатной температуре. Концентрация клеток при этом должна быть 1-4 х $10^6$ кл/мл, более точно подбирали для каждой линии клеток эмпирически. Клеточную суспензию разливали по 1,0 мл в стерильные пластиковые криоампулы (1,2 мл), максимально быстро, для получения одинаковой плотности клеток во всех ампулах. Маркировали, указывая название штамма, номер и дату пассажа. Оптимальная скорость замораживания составляет обычно 1°С/мин. В условиях лаборатории этого достигали - поместив ампулы в штатив, который в свою очередь, ставили в коробку из пенопласта с крышкой. Закрытую коробку переносили на 1 час в бытовой холодильник, далее на 1 сутки в морозильник на -70°С, после чего погружали в жидкий азот.

**Оттаивание клеток.** Для оптимального восстановления жизнеспособности клеток необходима высокая скорость их размораживания. Замороженные культуры вынимали из сосуда с жидким азотом и быстро помещали в водяную баню на 37°С. Как только суспензия полностью размораживалась, пересадку в культуральные флаконы проводили двумя способами:

1. Суспензию переносили во флакон и быстро добавляли 15 мл холодной питательной среды с сывороткой, оставляли на 10-15 минут, подсчитывали процент жизнеспособных клеток.

2. Суспензию переносили во флакон и медленно, по каплям, в течение 10 минут добавляли питательную среду с сывороткой, подсчитывали процент жизнеспособных клеток.

Независимо от способа переноса клеток в культуральные флаконы, культуры оставляли на сутки при оптимальной для данного вида рыб температуре: 15-16°С - для лососевых, 20-22°С – карповых и осетровых. Через 24 часа среду заменяли и продолжали стандартное культивирование.

При длительном хранении ежегодно одну ампулу рекультивировали после размораживания. При этом определяли процент жизнеспособных клеток, пролиферативную митотическую активность, модальный класс хромосом, отсутствие контаминации, описывали морфологических свойства культуры.

**Оценка выхода клеток.** Для оценки выхода клеток после замораживания использовали несколько методов. Самый простой – тест на исключение красителя, однако он давал завышенную оценку жизнеспособности клеток, так как окраска трипановым синим часто не выявляла значительную долю поврежденных клеток, которые погибали в первые сутки культивирования. Для клеток, выращиваемых в монослое, более точную оценку выживаемости получали путем анализа эффективности клонирования. При этом важно, что результаты менялись в зависимости от ростовой среды, субстрата, продолжительности инкубации, поэтому для сравнения различных препаратов замороженных клеток следует стандартизировать условия культивирования. Подробно эти методы описаны во многих иностранных и отечественных пособиях (Muldrew K. 1999, Wolfw J. 2004, Животная клетка в культуре…2000, 2009).

**Результаты и обсуждение.** Результаты проведенных сотрудниками лаборатории ихтиопатологии исследований, выход жизнеспособных клеток (в %), после криогенизации перевиваемых линий клеток рыб по различным методикам* представлены в табл. 2.

Для линий клеток полученных от лососевых видов рыб мы рекомендуем использовать среду, содержащую 15 частей фетальной сыворотки, от осетровых рыб – 30 частей. Культуры клеток EPC и FHM хорошо переносят заморозку, хранение более 8 лет в жидком азоте и легко рекультивируются независимо от состава криозащитной среды.

Помимо оценки выхода клеток после замораживания в жидком азоте определяли качество клеточных линий и по другим параметрам, включая подтверждение вида и доказательство отсутствия загрязнения грибами, бактериями, микоплазмой, чувствительность к вирусам.

Таблица 2.

Выход жизнеспособных клеток (в %), после криогенизации перевиваемых линий клеток рыб по различным методикам* (n=5)

| Номер методики (согласно табл. 1) Линии клеток Происхождение/название | | №1 | №2 | №3 |
|---|---|---|---|---|
| карповые | EPC | 86-89 | 85 | 85 |
| | FHM | 87-89 | 87-89 | 87-89 |
| лососевые | CHH-1 | 65-67 | 90-98 | 80-82 |
| | CHSE-214 | 80-86 | 85-90 | 78-82 |
| | RTG-2 | 80-85 | 85-87 | 70-72 |
| | OMG | 80-82 | 80 | 76-78 |
| | STLE | 80-83 | н.и. | н.и. |
| осетровые | WSSK-1 | 87-89 | 80-85 | 65-67 |
| | SSF(VIEV) - 1 | 75-80 | 70-72 | 69-72 |
| | SSF(VIEV) - 2 | 80-89 | 70-75 | 70-74 |
| | SSF(VIEV) - 3 | 80 | 80-82 | 75-80 |

н.и. – не исследовали

*- концентрация клеток во всех случаях составляла 3-4 млн.кл/мл

**Заключение.** Хранение в жидком азоте не оказывает отрицательного влияния на стабильность кариотипа, культурально-морфологические характеристики, чувствительность к вирусам как диплоидных штаммов, так и постоянных клеточных линий. Жизнеспособность культур замороженных по приведенным в данном исследовании методикам составляет 85-89%.

**Литература**

1. Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В. Итоги научных исследований и перспективы развития клеточной биотехнологии, Труды ВИЭВ, 2008. т.74. с.127-141.

2. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) /Под ред. проф. Дьяконова Л.П., / 2-е изд., доп. М. 2009.

3. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) /Под ред. проф. Дьяконова Л.П., проф. Ситькова В.И./ М. 2000

4. Завьялова Е.А. Богданова П.Д. Получение и биологические свойства культуры клеток из эмбрионов кумжи (*Salmo truttae L.*), Труды ВИЭВ, 2013. т.77. С .246-249

5. Завьялова Е.А., Пичугина Т.Д. Методы культивирования тканей и клеток рыб/ в кн: Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) /Под ред. проф. Дьяконова Л.П. М., 2009

6. Кулешов К.В. Определение видовой принадлежности культур клеток методами молекулярно-генетического анализа./ Диссерт.на соиск.уч.ст.канд.биол.наук, Щелково. 2009. 24с.

7. Чернов В.М., Чернова О.А. Микоплазменные инфекции как возможный фактор генетических изменений в клетках высших эукариот / Цитология. 1996. т.38. №2. С.107-114

8. Animal cell culture/ A practical approach, Edited by R.I.Freshney, IRL Press Oxford, Washington DC, 1989, 332 pp.

9. Hedrick R.P., McDowell T.S., Lannan C.N. Two cell lines from white sturgeon. Transaction of the American Fisheries Society. 120 №4. 1991. p.528-534

10. Heidrun I. Wergeland, Ragnhild Aarke Jakobsen. A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISA) // J.Dis.of Aquat. Org.Vol. 2001, 44: 183-190

11. Muldrew Ken, Cryobiology - A Short Course., University of Calgary, Canada, 1999.

12. Wolfw J. and Bryant G. Cryobiology and anhydrobiology of cells, University of New-South-Wales, Sidney, Australia, 2004.

## КРИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ

**Зайцева О.О., Полежаева Т.В., Гюнтер Е.А., Худяков А.Н., Соломина О.Н., *Костяев А.А., *Утемов С.В.**

*ФГБУН Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия,*
**ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России, Киров*

E-mail: ddic@yandex.ru

Любое растение на нашей планете обладает своей стратегией устойчивости к холоду. Организма либо «уходит» от замерзания путем стабилизации переохлажденного состояния за счет удаления всех потенциальных нуклеаторов и выдерживает замерзание до -20°С, либо повышает свою устойчивость к замерзанию путем активации синтеза полиолов, сахаров, антифризных белков и других веществ, чем существенно снижает летальную температуру. У большинства растений при естественной в природе скорости снижения температуры лед образуется исключительно в межклетниках, при температуре окружающей среды -2°С активируется гидролиз олигосахаридов на моносахариды, которые обладают криозащитным действием (Белоус А.М., Грищенко В.И. 1994). С наступлением холодов в клетках закаливающихся растений простые белки формируют сложные комплексы с углеводами. Такие комплексы способствуют снижению температуры формирования кристаллов льда и обезвоживанию клеток при низких температурах окружающей среды. Трудность выделения из растений полисахаридов и пектинов длительное время не позволяла использовать их криозащитные свойства в практической криобиологии. Современные технические достижения позволяют получать данный класс природных криопротекторов и разрабатывать новые технологии криоконсервирования биообъектов под их защитой.

При изучении эффективности композиций криозащитных растворов для замораживания и хранения клеток крови человека в состоянии криоанабиоза ранее нами установлено, что присутствие пектиновых полисахаридов: лемнана из ряски малой *Lemna minor L.* (Соломина О.Н. и др., 2010) или танацетана из пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. (Зайцева О.О., Худяков А.Н., Лаптев Д.С., 2012), или комарумана из сабельника болотного *Comarum palustre* L. (патент РФ №2464991), или раувольфиана из раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina Benth* (заявка на изобретение) в замораживаемой биологической среде существенно усиливает действие глицерина и сохраняет функциональные и морфологические показатели лейкоцитов периферической крови доноров-добровольцев на высоком уровне. Мы полагаем, что криопротекторный эффект растительных полисахаридов обусловлен наличием в их составе активных функциональных групп -ОН, -СООН, а также степенью разветвления самой макромолекулы.

Источником природных криопротекторов могут быть не только высшие растения, но и микроводоросли, особенно «проживающие» в условиях Севера. В ответ на резкие изменения температуры, повышенный уровень радиации, дефицит элементов питания они способны трансформировать и адаптировать свой фотосинтетический аппарат и метаболизм, что может отразиться на своеобразии пигментов, липидов, полисахаридов и других веществ в отличие от микроводорослей умеренных и южных широт. В качестве источника полисахарида была выбрана зеленая микроводоросль Scotiellopsis terrestris приполярного Урала.

Объектом исследования явились лейкоциты человека, полученные из цельной донорской крови (доноры-добровольцы 35,6 ± 5,2 лет) методом цитафереза. Количество лейкоцитного концентрата в среднем составляло 22,0 ± 2,0 мл.

Выделенный из микроводоросли полисахарид (78 кДа) имел следующий состав: галактоза – 1,3%, арабиноза – 0,5%, рамноза – 3,0%, глюкоза – 3,1%, ксилоза – 1,6%, манноза – 34,3%.

Лейкоцитный концентрат в соотношении 1:1 смешивали с консервантом, содержащим глицерин (7% (масса/объем, здесь и далее), трилон Б (0,1%) и полисахарид (0,2%), разливали по микропробиркам по 2 мл, выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут и замораживали. В опытах с температурой хранения -10°С микропробирки для замораживания и хранения погружали в охлажденную спиртовую (этиловый) ванну электрического морозильника на -10°С «ЗИЛ» (Россия). В опытах с температурой -20°С микропробирки погружали в охлажденную спиртовую ванну электрического морозильника «Derby» (Дания) на -20°С на 15 мин, после чего перекладывали для хранения в воздушную камеру данного морозильника. В опытах с температурой -40°С микропробирки погружали в охлажденную спиртовую ванну электрического морозильника «Криостат» (Украина) на -28°С на 15 мин, затем переносили для дальнейшего замораживания и хранения в воздушную камеру электрического морозильника «Derby» (Дания) на –40°С.

Деконсервирование биообъекта производили через 1 сутки хранения в 20-литровой водяной ванне при температуре +38°С до температуры клеточной взвеси +2 - +4°С.

Степень криоустойчивости различных популяций лейкоцитов определяли с помощью метода световой микроскопии (Nikon H550S) в мазках (окраска по Май-Грюнвальду и Романовскому). Общее количество лейкоцитов определяли в камере Горяева. Целостность клеточной мембраны лейкоцитов оценивали с помощью 1%-ного раствора суправитального красителя эозина методом световой микроскопии, признаком повреждения клеточной мембраны считали диффузное окрашивание цитоплазмы в розовый цвет. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по модифицированному методу (Потапова С.Г. и др., 1977) с использованием инертных частиц латекса («Sigma-Aldrich» Германия) диаметром 0,08 мкм. Определяли процент фагоцитирующих клеток. При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение ± среднее квадратичное отклонение (M±д). Для выявления статистической значимости различий между группами применяли непараметрический критерий Уилкоксона (Гланц С., 1998) с использованием компьютерной программы для медико-биологической статистики «BIOSTAT».

Ранее нами было показано (Сведенцов Е.П., 2008), что криопротектор проникающего действия глицерин в нетоксичной концентрации 7% оказывает слабый криозащитный эффект при замораживании лейкоцитов до -10°С (n=10): сохранность общего числа клеток 78,1±1,5%; эозиноустойчивость выявлена у 88,7±1,7% лейкоцитов, сохранность гранулоцитов – 17,1±2,9%, определить способность к фагоцитозу было невозможным). Установлено, что экзогенный полисахарид из микроводоросли Scotiellopsis terrestris усиливает действие глицерина и сохраняет функциональные и морфологические показатели лейкоцитов периферической крови доноров-добровольцев на высоком уровне при криоконсервировании в течение 1 суток при -10°С. При дальнейшем снижении температуры хранения криозащитное действие полисахарида снижается.

Таким образом, впервые показано, что полисахарид микроводоросли Scotiellopsis terrestris приполярного Урала обладает криопротекторными свойствами и предотвращает разрушение биологических мембран лейкоцитов крови человека крови при охлаждении до -10°С и при последующем отогреве.

Таблица.

Показатели сохранности лейкоцитов (М±у, в % к уровню до замораживания), перенесших воздействие различных отрицательных температур в течение 1 суток в криозащитном растворе, содержащем гдицерин и экзогенный полисахарид из микроводоросли *Scotiellopsis terrestris*

| Температура хранения, °С | n | Общее количество лейкоцитов | Количество клеток устойчивых к витальному красителю | Количество гранулоцитов | Количество фагоцитирующих нейтрофилов |
|---|---|---|---|---|---|
| -10 | 8 | 98,0±3,5 | 79,8±7,9 | 65,3±17,9 | 93,8±4,9 |
| -20 | 6 | 68,5±3,9 | 69,7±9,7 | 37,0±4,2 | гибель клеток |
| -40 | 6 | 69,5±4,3 | 78,7±13,3 | 39,8±11,9 | гибель клеток |

**Литература**

1. Белоус А. М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев: Наукова думка. 1994. 431 с.

2. Гланц С. Медико-биологическая статистика.М. : Практика.1998. 459 с.

3. Зайцева О.О., Худяков А.Н., Лаптев Д.С. Применение пектина пижмы обыкновенной для криоконсервирования лейкоцитов при -20°С. Гематология и трансфузиология. 2012. Т. 57, №2. С. 39-40.

4. Пат.2464991 Российская Федерация. Хладоограждающий раствор для замораживания ядерных клеток крови / Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Деветьярова О.Н., Утемов С.В., Костяев А.А., Щеглова О.О., заявители и патентообладатели: Учреждение РАН Ин-т физиологии Коми НЦ и ФГУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА. - № 2011129512/15; заявл. 15.07.2011; опубл 27.10.2012; Бюл. №30.

5. Потапова С.Г., Хрустиков В.С., Демидова Н.В., Козинец Г.И. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса. Проблемы гематологии и переливания крови. 1977. № 9. С. 58-59.

6. Соломина О.Н., Сведенцов Е.П., Зайцева О.О., Полежаева Т.В., Оводова Р.Г., Головченко В.В., Лаптев Д.С., Худяков А.Н., Степанова Е.С., Оводов Ю.С. Криопротекторные свойства ряда пектинов. Доклады Российской академии наук. 2010. Т. 430, № 4. С. 559-561.

7. Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Оводова Р.Г., Головченко В.В., Зайцева О.О., Соломина О.Н., Степанова Е.С., Оводов Ю.С. Криозащитное действие лемнана, пектина ряски малой. Доклады Российской академии наук. 2008. Т.421, №4. С. 559-561.

## СОХРАННОСТЬ КОНЦЕТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ (-79°С) И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ (-196°С)

**Коробкова А.В., Компаниец А.М.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: annakorobkovaffm@list.ru

В институте разрабатывается новый подход к созданию криоконсервантов для замораживания концентратов тромбоцитов (КТ), заключающийся в использовании сочетания двух криопротекторов в растворе в разных комбинациях (Компанієць А.М., Книш О.В., Гуріна Т.М. та ін., 2006; Компаниец А.М., Богданчикова О.А., Пахомова Ю.С. и др., 2012). Эффективность комбинированных криоконсервантов исследована при контролируемом (программный замораживатель) и неконтролируемом (пары азота) замораживании КТ с различными скоростями охлаждения и последующим хранением в жидком азоте (–196°С) (Богданчикова О.А., Киреев В.А., Ходько А.Т., Компаниец А.М.,2010).

Цель настоящей работы – изучение сохранности показателей функциональной полноценности КТ, криоконсервированных в комбинированных криоконсервантах при разных температурных режимах (-79° и -196 °С).

Материалы и методы. Концентрат тромбоцитов для исследований выделяли из отдельных доз донорской крови (гемоконсервант «Глюгицир») методом из лейкотромбоцитарного слоя. Перед проведением экспериментов КТ хранили в течение 12-16 ч на автоматической мешалке (ИПКиК НАН Украины) со скоростью перемешивания 2 об/мин. при 22±2°С

В работе использованы растворы, содержащие комбинации диметилацетамида (ДМАЦ) с 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), глицерином и оксиэтилированным глицерином со степенью полимеризации n=5 ($ОЭГ_{n=5}$) – ДМАЦ/1,2-ПД, ДМАЦ/$ОЭГ_{n=5}$, ДМАЦ/глицерин, 10%-ая суммарная концентрация криопротекторов в плазме. Перед замораживанием образцы КТ медленно, при постоянном перемешивании, соединяли с криозащитными средами в соотношении 1:1, время экспозиции – 30 мин. Дополнительным контролем эффективности комбинированных криоконсервантов служили результаты криоконсервирования КТ с 10% ДМСО в плазме.

Образцы суспензии тромбоцитов (6 мл) замораживали в полимерных (на основе фторопласта) контейнерах прямоугольной формы, размерами 30Ч100 мм, вместимостью 10 мл. Исследовали три режима замораживания: 1 – в механическом рефрижераторе при температуре –79°С; 2 – в парах жидкого азота при температуре –188…–193°С с последующим хранением при –196°С; 3 – в парах жидкого азота при – 188…–193°С до температуры –70…–75°С с последующим хранением при –79°С. Перед замораживанием контейнеры с образцами КТ предварительно помещали в металлические холдеры; при замораживании в парах азота размещали горизонтально на пенопластовой платформе, расположенной на поверхности азота, выдерживали на платформе рассчитанное время и затем помещали в жидкий азот или механический рефрижератор.

Изменение температуры в замораживаемых образцах КТ определяли с помощью медь-константановой термопары, рассчитанная скорость охлаждения на разных этапах составляла: от 0,5 до 7°С/мин (замораживание при температуре–79°С) и от 1,7 до 25°С/мин (замораживание в парах азота). Контейнеры с замороженными образцами КТ хранили от 1 недели до 1 месяца. Образцы отогревали на водяной бане при 37°С при постоянном покачивании. После размораживания подсчитывали количество восстановленных тромбоцитов в образцах. Сохранность показателей функциональной полноценности криоконсервированных КТ оценивали после удаления криопротекторов (Грищенко В.І., Компанієць А.М., Книш О.В., 2006) по следующим тестам *in vitro*: реакция на гипотонический шок (РГШ), АДФ- и коллаген-индуцированная агрегация (фотометрический метод), ретракция сгустка. Полученные результаты измерений выражали в процентном отношении к соответствующим показателям для свежевыделенных КТ.

Величины РГШ и агрегации измеряли на анализаторе «Colysagraph» (США) с графической регистрацией процесса на самописце «Endim» 622.01 (Германия). В работе использовали следующие индукторы агрегации: растворы АДФ (конечная концентрация 200мкМ и 50 мкМ, «Serva») и коллагена (конечная концентрация 20 мг/мл, «Технология-СТАНДАРТ», Беларусь).

Ретракцию тромбоцитарного сгустка определяли следующим образом: к 1 мл суспензии тромбоцитов, содержащей 1Ч$10^5$/мкл, вводили 0,1 мл 5%-го $CaCl_2$, тщательно перемешивали и помещали в термостат 37$^o$C. Через 1 ч измеряли объем ретрагированной плазмы. Ретрактильную активность выражали в процентном соотношении объема ретрагированной плазмы к общему объему исследуемой взвеси тромбоцитов (1,1 мл).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel с применением критерия Стьюдента.

Результаты исследований. Проведенные исследования показали (таблица), что в образцах криоконсервированных КТ, независимо от состава криоконсерванта и применяемых режимов замораживания, сохранялось от 90 до 94% тромбоцитов.

Показатели функциональной полноценности криоконсервированных тромбоцитов - величина АДФ- и коллаген-индуцированной агрегации, РГШ и ретракции сгустка зависели как от состава криоконсерванта, так и режима замораживания, определяющего прежде всего скорость охлаждения в разных температурных диапазонах.

Так, в результате замораживания КТ в механическом рефрижераторе при –79°C (режим 1) показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, криоконсервированных в растворе ДМСО и комбинированной среде ДМАЦ/$ОЭГ_{n=5}$ были одинаковыми, а в средах ДМАЦ/глицерин и ДМАЦ/1,2-ПД –несколько ниже. Уровень сохранности таких параметров, как РГШ, ретракция, коллаген-индуцированная агрегация был выше для ДМСО по сравнению с комбинированными криоконсервантами.

Криоконсервирование КТ в комбинированных средах с использованием режимов замораживания 2 и 3 обеспечивало более высокие показатели функциональной полноценности тромбоцитов независимо от конечной температуры замораживания и хранения (–196$^o$C и –79°C). Наиболее высокие результаты получены для криоконсерванта, содержащего комбинацию проникающего амида ДМАЦ и криопротектора смешанного типа $ОЭГ_{n=5,}$ превышающие результаты замораживания КТ с ДМСО при всех 3–х режимах.

Таблица.

Показатели сохранности криоконсервированных концентратов тромбоцитов в зависимости от состава криоконсерванта и режима замораживания (M±δ)

| | Состав криоконсерванта | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5% ДМАЦ + 5% ОЭГ | | | 5% ДМАЦ + 5% глицерин | | | 5% ДМАЦ + 5% 1,2-ПД | | | 10 % ДМСО | | |
| Показатели | Режимы замораживания | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| Количество тромбоцитов в КТ, % | 92,0 ± 6, 2 | 94,0 ± 4,6 | 92,7 ± 5,0 | 91,0 ± 3,6 | 92,0 ± 3 | 90,7 ± 2,3 | 89,3 ± 2,5 | 90,3 ± 1,5 | 90,3 ± 2,1 | 92,7 ± 4,0 | 90,0 ± 4,6 | 90,3 ± 2,1 |
| АДФ (200 мкМ), % | 26,0 ± 6,2 | 53,7 ± 8,5 | 39,0 ± 8,9 | 18,7 ± 7,6 | 38,0 ± 8,5 | 32,3 ± 8,5 | 17,0 ± 6,0 | 29,7 ± 8,7 | 27,7 ± 9,6 | 25,0 ± 5,3 | 17,7 ± 6,4 | 13,7 ± 7,3 |
| АДФ (50 мкМ), % | 16,3 ± 5,7 | 30,1 ± 7,1 | 24,7 ± 8,1 | 15,7 ± 3,2 | 25,3 ± 5,5 | 21,3 ± 4,0 | 13,7 ± 6,7 | 20,3 ± 6,8 | 18,3 ± 3,5 | 16,7 ± 5,1 | 11,3 ± 3,5 | 3,8 ± 3,8 |
| Коллаген (20 мг/мл), % | 24,0 ± 9,8 | 44,0 ± 10,8 | 33,3 ± 8,5 | 11,7 ± 4,7 | 28,7 ± 6,5 | 24,7 ± 5,1 | 19,0 ± 10,1 | 41,7 ± 9,7 | 37,0 ± 10,6 | 43,0 ± 8,5 | 35,7 ± 6,0 | 33,7 ± 3,1 |
| РГШ, % | 35,7 ± 8,9 | 66,7 ± 7,8 | 59,0 ± 8,7 | 40,7 ± 2,2 | 50,3 ± 5,8 | 48,0 ± 10,7 | 36,7 ± 8,4 | 52,3 ± 8,4 | 47,3 ± 11,6 | 50,0 ± 6,0 | 34,3 ± 6,4 | 31,7 ± 7,6 |
| Ретракция, % | 59,7 ± 2,9 | 81,0 ± 5,3 | 76,3 ± 4,2 | 62,0 ± 4,0 | 74,7 ± 5,8 | 70,0 ± 6,0 | 62,3 ± 2,4 | 73,7 ± 5,8 | 68,0 ± 4,7 | 72,0 ± 2,7 | 67,0 ± 6,0 | 65,0 ± 2,7 |

1- замораживание и хранение при -79°С

2- замораживание в парах жидкого азота (-188…- 193 °С), хранение при -196°С

3- замораживание в парах жидкого азота (-188…- 193°С), хранение при -79°С

Эффективность криоконсервирования тромбоцитов зависит от многих параметров, в частности таких, как скорость охлаждения, величина переохлаждения, длительность плато кристаллизации. При замораживании КТ с ДМСО предпочтительно использование медленных скоростей охлаждения, выдерживание определенной длительности плато кристаллизации (Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al., 2006). Криоконсервирование КТ с комбинированными криоконсервантами предусматривает использование более высоких скоростей охлаждения, предотвращение переохлаждения внеклеточной среды, быстрое прохождение плато кристаллизации (Богданчикова О.А., Киреев В.А., Ходько А.Т., Компаниец А.М., 2010).

Результаты исследований, представленные в данной работе, свидетельствуют о возможности повышения эффективности криоконсервирования тромбоцитов в механическом рефрижераторе при температуре –79°С за счет использования комбинированных криоконсервантов и более быстрого замораживания КТ в парах жидкого азота до температуры –70…–75°С с последующим хранением при умеренно низкой температуре (–79°С).

**Литература**


1.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.

2. 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.

3. Компаниец А.М., Богданчикова О.А., Пахомова Ю.С. и др. Криозащитные среды на основе комбинаций криопротекторов для замораживания биологических объектов // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины /Под ред. акад. НАН Украины А.Н.Гольцева. Харьков:2012. С. 101-126.

4. Пат. № 15014 Україна, МПК8 A0N 1/02. Спосіб видалення кріопротектора із суспензії тромбоцитів / В.І. Грищенко, А.М. Компанієць, О.В. Книш. Заявлено 18.11.05; Опубл. 15.06.06, Бюл. №6.

5. Balint B., Paunovic D., Vucetic D. et al. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion.2006. Vol. 46, N2.P. 230-235.


## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ММСК КРС)


**Коровина Д.Г.[1,2], Артамонова М.П.[2]**

*1. ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии, Москва, Россия*

*2. ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия*

E-mail: daryakorovina@gmail.com


Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), выделенные из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) крупного рогатого скота (КРС), представляют собой перспективный биологический материал для использования в сельскохозяйственной, в том числе и пищевой биотехнологии. ММСК могут пролиферировать в культуре длительное время, формируя стабильные диплоидные клеточные линии. Клетки способны заселять матрицу-носитель, дифференцироваться в заданном направлении и формировать трехмерные структуры, которые позволяют моделировать ту или иную ткань in vitro.

Криоконсервация является ключевым процессом, а также необходимым условием для долгосрочного хранения и успешного применения ММСК в биотехнологии. Целью исследования было сравнить жизнеспособность ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС при одинаковых условиях их криоконсервации и последующего размораживания.

В серии экспериментов использовались ММСК КРС полученные и охарактеризованные нами ранее (Волкова И.М. и др., 2012; Савченкова И.П. и др., 2012). Основной средой для культивирования клеток была среда ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л) (DMEM-LG), дополненная 10 %-ми сыворотки плодов коров (HyClone, США) и антибиотиками (конечная концентрация пенициллина была равна 50 Ед/мл, стрептомицина - 50 мкг/мл). Для криоконсервации в качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) (ПанЭко, Россия). В состав криозащитной среды входили: DMEM-LG (50%), СПК (40%) и ДМСО (10%). Эффективность восстановления клеток оценивали путем определения жизнеспособности с помощью окраски 0,1%-ым раствором трипанового синего.

Клеточный монослой ММСК на 4-ом пассаже культивирования отмывали от среды фосфатно-солевым буфером Дюльбекко без ионов $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ (ФСБ-2), снимали с субстрата 0,25% раствором трипсина (ПанЭко, Россия). Количество клеток в суспензии считали в камере Горяева и осаждали низкоскоростным центрифугированием при 100 g в течение 5 мин. Осадок растворяли в среде с криопротектором из расчета $1x10^6$ на 1 мл криосреды. Ампулы с клеточной суспензией охлаждали в полистериновой коробке при -70$^0$С. При длительном хранении замороженные клетки хранили в жидком азоте при -196$^0$С.

При размораживании ампулы помещали в водяную баню при 37$^0$С до полного растворения ледяных кристаллов. После чего переносили их содержимое в центрифужную пробирку с 5 мл ростовой среды и осаждали низкоскоростным центрифугированием (100 g, 5 мин). Затем ресуспендировали клетки в питательной среде, оценивали их жизнеспособность и культивировали в культуральном флаконе (площадь 25 $см^2$) в $CO_2$–инкубаторе при температуре 37°С и концентрации $CO_2$ 5% до формирования клеточного монослоя. Данные, полученные из повтора трех экспериментов, обрабатывали статистически с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа (Carl Zeiss, Германия) и специального программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8.

В результате проведенных исследований было установлено, что жизнеспособность ММСК, выделенных из ЖТ, после криоконсервации и размораживания составила 95%, а жизнеспособность ММСК, выделенных из КМ, была равна 91%. Показано, что, несмотря на фенотипическое сходство в популяциях ММСК из КМ и ЖТ, эти клетки обладают разными потенциями к восстановлению после размораживания.

Полученные результаты в целом свидетельствуют о том, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ, могут успешно подвергаться криоконсервации, сохраняя при этом максимальный уровень жизнеспособности, при замораживании в среде, состоящей из 10% ДМСО в сочетании с 40% СПК и 50% DMEM-LG.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

**Луценко Е.Д., Останков М.В., Гольцев А.Н.**

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

Ранее показано, что клетки, полученные из плаценты, экспрессируют маркеры, типичные для костномозговых, нервных, печеночных клеток. Вместе с тем, охарактеризовать иммунологическиий потенциал выделенных клеток представляется сложным в виду неопределенности их фенотипических характеристик. Применение клеток плаценты с терапевтической целью предусматривает использование криоконсервированного материала, что определяет важность изучения влияния факторов криоконсервирования на этот биологический объект.
Поэтому целью работы было определение возможности модификации популяционного состава суспензии плаценты в зависимости от выбранного режима криоконсервирования.

**Материалы и методы.** Клетки плаценты выделяли из хориального участка ткани зрелой плаценты у мышей 18-19 суток гестации по методу (метод. рекоменд., наук. ред. Грищенко В.І., 1997). Выделенную ткань отмывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), измельчали и дезинтегрировали в гомогенизаторе Поттера, фильтровали через нейлоновый фильтр. Количество ядросодержащих клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева в световом микроскопе «ЛОМО», х400.

Криоконсервирование суспензии клеток плаценты (СКП) проводили в криопробирках (Nunc, Roskilde, Denmark). В СКП, содержащую $5x10^6$ клеток в 0,5 мл ЗФР, медленно вводили 0,5 мл 10% или 20% раствора криопротектора ДМСО или пропандиосахароля (ПДС). Конечная концентрация криопротекторов составила 5% или 10%, соответственно. Образцы криоконсервировали на программном замораживателе (УОП-1, производства ОП ИПКиК НАН Украины) с автоматической записью двухэтапного режима охлаждения: на 1-м этапе – со скоростью $1^0$ /мин до - $40^0$ и на 2-м – погружение в жидкий азот. Отогрев СКП проводили при $42^0$С на водяной бане в течение 1-2 мин при постоянном встряхивании пробирок. Криопротектор удаляли однократным разбавлением ЗФР (1:1) с последующим центрифугированием (1000 об/мин, 10 мин).

Морфологический состав суспензии клеток плаценты до и после криоконсервирования определяли с помощью световой микроскопии мазков, фиксированных метанолом и окрашенных по Романовскому-Гимзе в световом микроскопе «ЛОМО», x900.

Методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к мембранным структурам CD45, CD3, CD4, CD25 (BD Pharmingen TM) определяли количество экспрессирующих эти маркеры клеток. Исследования проводили на проточном цитофлюориметре (FACS Calibur, BD).

Экспрессию гена идо определяли методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции в режиме реального времени на анализаторе нуклеиновых кислот (АНК-16, Россия) и полуколичественным анализом ОТ-ПЦР с разделением, детекцией и количественным анализом ПЦР-продуктов в чип-анализаторе Agilent 2100 Bioanalizer (США). Праймеры для гена идо были сконструированы на основе базы данных, опубликованной на сайте «GenBank» NM_008324.1. Результаты были нормированы относительно показателя экспрессии гена 18SrRNA (NR_003278.3) (housekeeping gene).

**Результаты.** В ряде исследований показана способность клеток, выделенных из плаценты, продуцировать иммуноактивные молекулы и супрессировать Т-клеточный ответ in vitro и in vivo (Талаев В.Ю. и соавт., 2004, Луценко Е.Д., 2010). Особый интерес представляет возможность идентификации в суспензии $СД4^+СД25^+$ Т-регуляторных клеток (Т-рег), которые играют существенную роль в индукции и поддержании толерантности и предотвращении развития аутоиммунных реакций. Например, показано, что при адоптивном переносе эти клетки способны оказывать терапевтическое действие у животных в модели коллаген-индуцированного артрита (Morgan M.E., 2005).

Полученные результаты показали, что криоконсервирование под защитой 10% ДМСО обеспечивает сохранность максимального количества ядросодержащих клеток, выделенных из плаценты (90,9%±5,4), по сравнению с другими используемыми режимами (рис. 1). Эти же условия криоконсервирования обеспечили наилучшие показатели при определении содержания $CD45^+$, $CD3^+$ клеток.

По результатам световой микроскопии можно отметить, что замораживание суспензии с 10% ДМСО приводит к повышению содержания лимфоцитов по сравнению с нативной суспензией, что доказывает возможность перераспределения содержания клеточных популяций после криоконсервирования. Это было подтверждено данными проточной цитометрии, свидетельствующими о повышении количества $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ клеток в суспензии после криоконсервирования с 10% ДМСО, по сравнению с их количеством в нативной суспензии. Изменение содержания $CD45^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ клеток четко зависело от используемой концентрации ДМСО (рис. 2).

Количество ядросодержащих клеток, лейкоцитов ($CD45^+$), $CD3^+$ , $CD4^+$ клеток в СКП выше при использованиии ДМСО, чем после криоконсервирования с ПДС в соответствующих концентрациях. После криоконсервирования суспензии под защитой ПДС (в любой из выбранных концентраций) морфологически не были идентифицированы лимфоидные клетки. Использование различных концентраций раствора ПДС (5% и 10%) не приводило к достоверно значимым изменениям в содержании $CD45^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ клеток. Вместе с тем, можно отметить, что криоконсервирование с ПДС обеспечивало сохранение количества $CD4^+CD25^+$ клеток, аналогичное содержанию их в нативной суспензии.

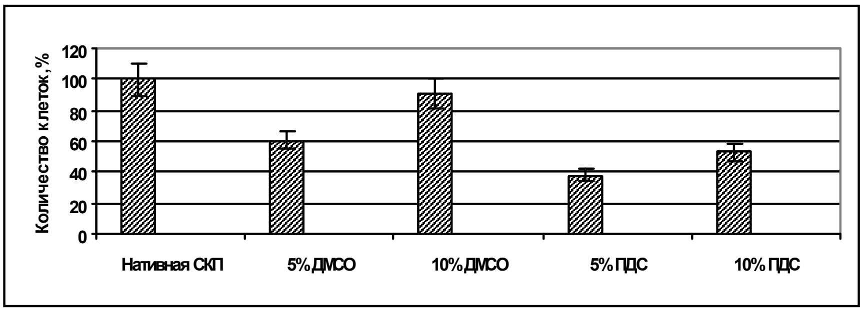



Рис.1.Количество ядросодержащих клеток в плаценте после криоконсервирования

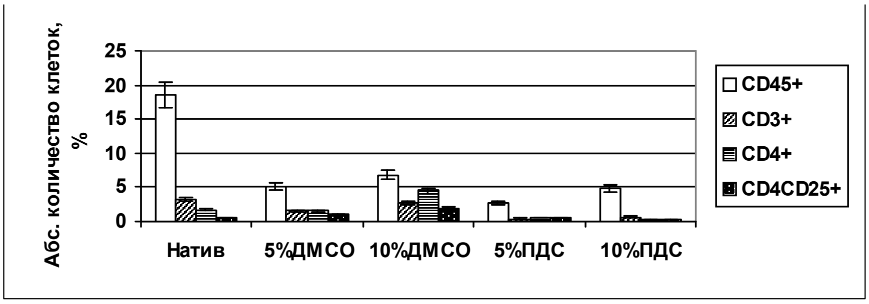



Рис.2. Содержание популяций клеток в суспензии клеток плаценты

Согласно современным представлениям клетки, экспрессирующие фермент индоламин-2,3 диоксигеназу (ИДО), вовлекаются в индукцию иммунной толерантности при физиологических и патологических условиях. Существуют данные, свидетельствующие о важности ИДО-активности в регуляции течения экспериментального коллагенового артрита, что теоретически обосновывает возможность локальной или системной индукции ИДО активности, либо использования экзогенных источников ИДО для лечения аутоиммунной патологии. Известно, высокая активность энзима ИДО характерна для плаценты, что способствует ингибиции пролиферации Т-клеток матери, и предотвращению отторжения тканей плода. При определении экспрессии гена идо клетками плаценты после криоконсервирования в различных условиях установлено, что в нативной и криоконсервированной СКП содержится мРНК гена ИДО. Было установлено, что криоконсервирование СКП под защитой ПДС приводит к усилению экспрессии исследуемого гена в клетках в сравнении с экспрессией, отмеченной при криоконсервировании клеток под защитой ДМСО, что может свидетельствовать о различиях в сигнальной активации исследуемого гена в выбранных условиях.

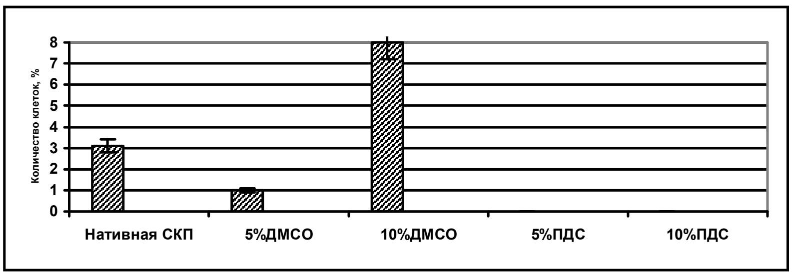



Рис. 3.Количество лимфоцитов в суспензии клеток плаценты

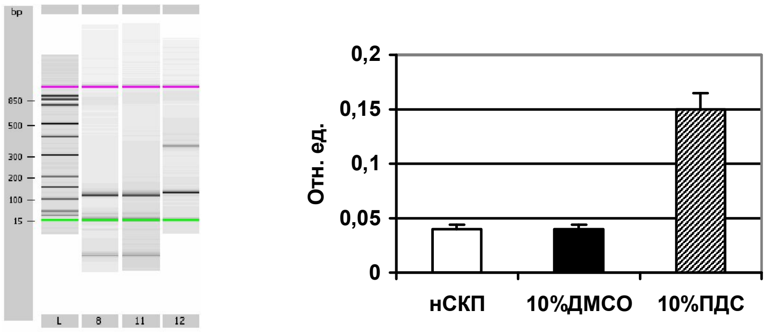



Рис.4.Экспрессия мРНК гена ИДО в нативных и криоконсервированных клетках плаценты

**Выводы.**

1. Криоконсервирование суспензии клеток плаценты с 10% ДМСО приводило к повышению в ней количества лимфоцитов по сравнению с их содержанием в нативной суспензии.

2. Установлено, что криоконсервирование СКП с ДМСО способствовало сохранению большего количества ядросодержащих клеток и всех исследованных популяций, чем после криоконсервирования с ПДС в соответствующих концентрациях.

3. Криоконсервирование с ПДС обеспечивало сохранение количества $CD4^{+}CD25^{+}$ на уровне содержания их в нативной суспензии.

4. Различное действие режимов криоконсервирования проявлялось в модификации состава клеточных популяций и внутриклеточных процессов - активности гена ИДО.

**Литература**

1. Приготування, зберігання та клінічне використання кріоконсервованої суспензії плаценти : [метод. рекоменд. /наук. ред. Грищенко В.І. та ін.]. Харків.1997. 10 с.

2. Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н. Влияние клеток цитотрофобласта плаценты человека на пролиферацию Т-лимфоцитов//Иммунология. 2004. №6. С.324-329.

3. 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. Харків.2010. С.325-332.

4. Morgan M.E., Flierman R., van Duivenvoorde L.M. et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. Arthritis Rheum., 2005, 52(7), 2212-21.

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОРДОВОЙ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДА КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

**Михайлова О.А., Рязанцев В.В., Бабийчук Л.А., Мигунова Р.К.**

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

E-mail: mixolya@mail.ru

В физиологически полноценной клетке при нормальных условиях механизмы антиоксидантной защиты создают устойчивое стационарное состояние с системами, продуцирующими активные формы кислорода (АФК). Поэтому, АФК, образующиеся в процессе нормального клеточного метаболизма, в основном из-за небольшой утечки электронов в дыхательной цепи митохондрий, а также в результате других окислительно-восстановительных реакций в органеллах и цитоплазме, не вызывают повреждения клетки. Однако уровень АФК, превышающий защитные возможности клетки, может вызывать нарушения за счет их высокой реакционной способности, позволяющей взаимодействовать с липидами, белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами. В высоких концентрациях АФК индуцируют процессы перекисного окисления липидов в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков и ДНК клетки, инактивацию ферментов (Дубинина Е.Е,. 2001). Криоконсервирование, которое сопровождается изменением физико-химических свойств среды, может приводить к возникновению физиологических нарушений в биологических объектах, вплоть до их гибели (апоптоза), что зачастую сопровождается продукцией АФК (Скулачев В.П., 1996). Рядом авторов было показано увеличение количества АФК в различных биообъектах после замораживания (Sandstrom P.A., 1994; Stoian I., 1996). В связи с этим, **целью данного исследования** была оценка продукции АФК ядросодержащими клетками (ЯСК) кордовой крови (КК) в зависимости от метода криоконсервирования.

**Материалы и методы.** Объект исследования – ЯСК КК человека, полученные при наличие информированного согласия роженицы. Концентраты ЯСК выделяли несколькими методами: седиментация в 3%-м полиглюкине (ЯСК 1), по разработанному нами методу двухэтапного центрифугирования (ЯСК 3) (Бабийчук Л.А., 2007) и центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (ЯСК 2) (Вцуum A., 1968). В качестве криопротекторов в работе использовали: проникающий в клетки диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5% и непроникающий полиэтиленоксид с м.м. 1500 (ПЭО) в конечной концентрации 10%. Концентрат ЯСК 1 замораживали с ДМСО и без него. Замораживание концентрата ЯСК 2 проводили с использованием 10% ПЭО. Клетки, выделенные фиколлом (ЯСК 3), замораживали с использованием 5% ДМСО или 10% ПЭО. Обработку клеток криопротекторами проводили при низкой положительной температуре (2ч, 4 °С) и замораживали до -196°С по специально разработанной двухэтапной программе на программном замораживателе CryoSON (Бабийчук Л.А., 2005). Иммунофенотипирование ядросодержащих ($CD45^+$) клеток, а также оценку продукции внутриклеточных АФК (с использованием 5 μМ дихлорфлуоресцин диацетата ($DCFH_2DA$)) проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD, США) с использованием реагентов фирмы BD. Оценивали регион на гистограммах, отмеченный маркером М1. Краситель $DCFH_2DA$ после попадания в клетку и отщепления диацильной группы теряет способность свободно ее покинуть, а образованный нефлуоресцентный $DCFH_2$, при наличии в клетке АФК, переходит в высокофлуоресцентную форму DCF (Bass D.A., 1983; Дамбаева С.В., 2001). Данные представлены в виде M±SE, достоверность различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с уровнем значимости 5%. Объем выборки составлял не менее 5 экспериментов.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ продукции АФК до и после выделения ЯСК из цельной кордовой крови, представленный на рис. 1, показал, что количество DCF-меченых ЯСК зависело от метода их выделения из цельной КК и становилось тем выше, чем большим воздействиям подвергались клетки в процессе выделения. Показано, что применение метода двухэтапного центрифугирования (ЯСК 3) характеризуется отсутствием достоверно значимых отличий количества DCF-меченных ЯСК, по сравнению с контрольными значениями в цельной кордовой крови (таблица). По-видимому, воздействие на клетки только физического фактора центрифугирования при данном методе выделения не влияет на их продукцию АФК.

При выделении клеток с использованием полиглюкина (ЯСК 1), кроме центрифугирования, происходит изменение состава внеклеточной среды при добавлении к клеткам данного высокомолекулярного вещества. В этом случае, при сочетанном действии физико-химических факторов, количество

DCF-меченных клеток в пробе повышалось до 8%, что видно из рис.1, по сравнению с контролем, но все же оставалось на достаточно низком уровне (табл.).

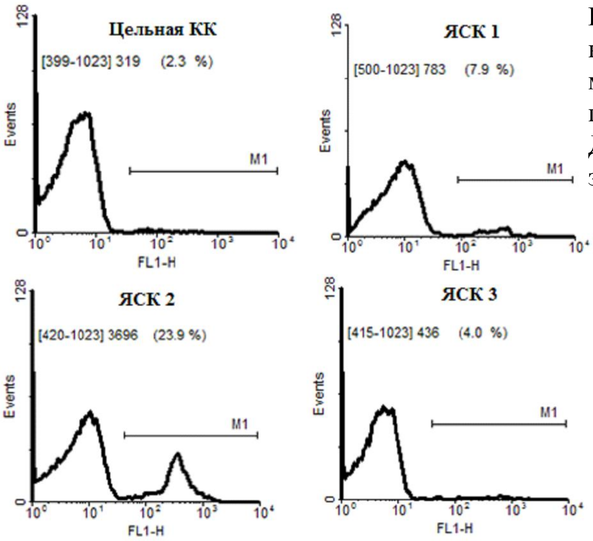



Рис. 1. Гистограмма количества DCF-меченых ЯСК КК до и после выделения. Данные типичного эксперимента.

Таблица.

Количество DCF-меченых ядросодержащих клеток до и после выделения из цельной кордовой крови различными методами.

| | | Выделение | Обработка криопротектором | Замораживание-отогрев |
|---|---|---|---|---|
| Цельная КК | | 4,73±2,45 | - | - |
| ЯСК 1 | ДМСО | 7,64±2,87 | 19,31±3,62* | 44,21±6,28* |
| | - | | | 36,41±8,63* |
| ЯСК 2 | ДМСО | 21,3±4,03* | 31,22±4,55* | 30,44±7,22 |
| | ПЭО | | 27,96±4,23 | 21,25±5,93 |
| ЯСК 3 | ПЭО | 3,8±1,31 | 11,18±2,81* | 42,73±6,28* |

*- данные отличаются от показателей до воздействия с уровнем $p<0,05$.

Самое значительное увеличение продукции клетками АФК происходило в концентрате, выделенном с использованием фиколла (ЯСК 2). Так, показатель количества DCF-меченых ядросодержащих клеток в данном случае возрастал в среднем в 5 раз (табл.), по сравнению с контрольными значениями в цельной кордовой крови.

Необходимо отметить, что популяционный состав концентратов ЯСК КК, полученный различными методами, отличается содержанием гранулоцитарных лейкоцитов. Именно данная популяция ЯСК, в силу своих особенностей строения (большое количество лизосом и пероксисом) и возможности быстро вступать на путь спонтанно развивающегося апотоза (Edwards S.W., 2003), может вносить определяющий вклад в уровень флуоресценции DCF всех CD45-клеток. Так, наименее обогащенным гранулоцитами является концентрат, полученный с использованием фиколла, который позволяет получить преимущественно мононуклеарную фракцию клеток. В связи с этим, можно предположить, что ЯСК, выделенные данным методом, должны иметь более низкий уровень флуоресценции DCF-меченых клеток, чем уровень в цельной кордовой крови. Однако, полученные нами данные по увеличению количества DCF-меченных клеток могут свидетельствовать об интенсификации внутриклеточной продукции АФК на фоне сочетанного повреждающего действия химических и физических факторов на мононуклеарную фракцию лейкоцитов в процессе выделения.

Последующее добавление к клеткам криопротекторов различного механизма действия показало, что обработка клеток ДМСО приводила к более значимой активации продукции клетками АФК, чем использование непроникающего ПЭО, что видно из рис. 2. В данном случае наглядным для сравнения действия криопротекторов различного типа является концентрат ЯСК 2, выделенный фиколлом и инкубированный как с ДМСО, так и с ПЭО (рис. 2). Видно, что проникающий ДМСО приводит к повышению продукции АФК в 1,5 раза, в то время как непроникающий ПЭО - в среднем в 1,3 раза. При этом, использование ДМСО, в отличие от ПЭО, приводит к достоверному увеличению данного показателя по отношению к начальному их количеству в соответствующем концентрате (таблица). Оценка продукции клетками АФК, после выделения полиглюкином и обработки ДМСО показала увеличение данного показателя в среднем на 11%, а после выделения клеток двухэтапным центрифугированием и инкубации с ПЭО – на 7% соответственно (табл.).

Самые значимые изменения продукции клетками АФК наблюдались после криоконсервирования. На данном этапе на клетки, находящиеся в стрессовых условиях, действуют дополнительные повреждающие факторы процедуры замораживания-отогрева, которые могут привести к развитию запрограммированной гибели особенно в клетках, имеющих сбои в работе антиоксидантной системы (АОС).

Было показано, что замораживание-отогрев клеток, как наиболее повреждающий этап в процессе криоконсервирования, приводит к существенным изменениям в работе их окислительно-восстановительной системы. Так, после криоконсервирования количество $CD45^+DCF^+$-клеток изменяется в разной степени, в зависимости от метода выделения и использованного криопротектора (рис. 3).

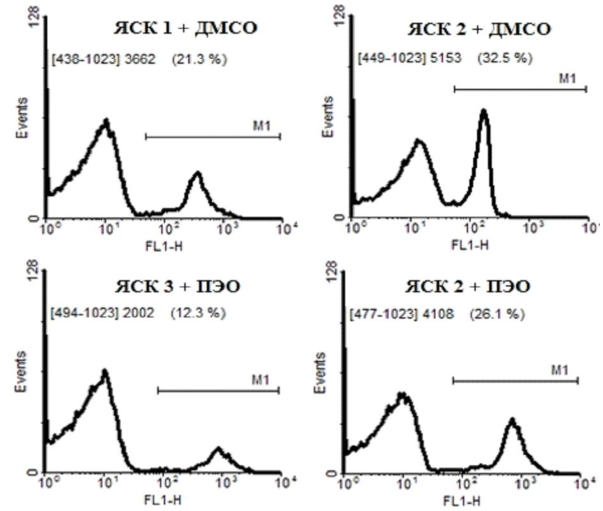



Рис. 2. Гистограмма количества DCF-меченых ЯСК КК в зависимости от метода выделения и обработки криопротектором. Данные типичного эксперимента.

При анализе продукции АФК клетками, выделенными с использованием полиглюкина и замороженными с ДМСО (ЯСК 1+ДСМО), а так же после выделения двухэтапным центрифугированием и замораживания под защитой ПЭО (ЯСК 3 +ПЭО), было показано достоверное увеличение количества DCF-меченых ядросодержащих клеток по сравнению с данными параметрами до замораживания-отогрева (табл.). В этих случаях количество клеток с повышенным внутриклеточным содержанием АФК увеличивалось в среднем до 44%. Однако, проведенный популяционный анализ позволил нам определить, что как в клетках, выделенных полиглюкином и замороженных с ДМСО (рис. 4), так и после выделения клеток двухэтапным центрифугированием и замораживания с ПЭО (аналогичное распределение популяций ЯСК), показатель продукции клетками АФК повышается в основном за счет популяции гранулоцитов и моноцитов, сохраняя большинство лимфоцитов в состоянии близком к нативному. Это совпадает с полученными нами ранее (Бабийчук Л.А., 2011) данными, где была показана высокая сохранность (72-80%) и жизнеспособность (более 82%) клеток, криоконсервированных данными методам. Кроме того было установлено, что основные потери клеток происходили за счет гранулоцитов. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемое повышение внутриклеточного содержания АФК может рассматриваться как ответ АОС клеток на изменение физико-химических свойств среды при замораживании-отогреве.

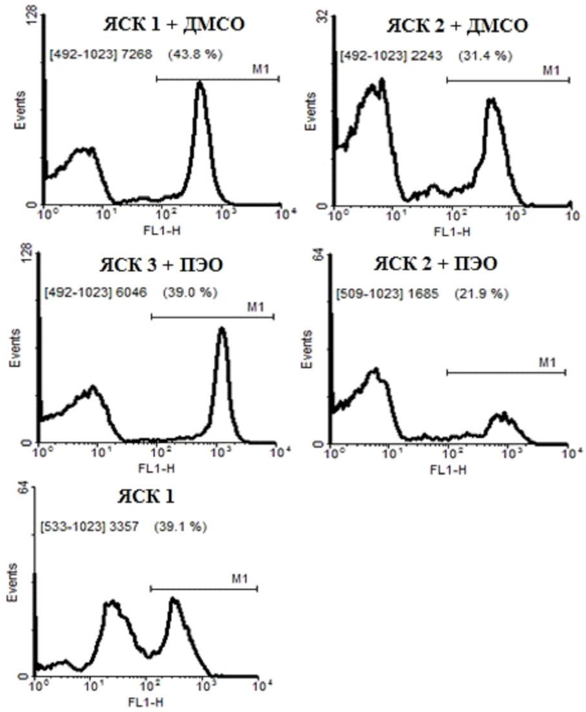



Рис. 3. Гистограмма количества DCF-меченых ядросодержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода криоконсервирования. Данные типичного эксперимента.

После замораживания-отогрева клеток, выделенных полиглюкином, в случае отсутствия в среде криоконсервирования ДМСО, наблюдалась тенденция к снижению продукции АФК, по сравнению с клетками, замороженными с ДМСО (табл.). Однако, если учесть что сохранность данных клеток после замораживания составляла порядка 56%, из которых жизнеспособными оставались всего 32% клеток (Бабийчук Л.А., 2011), такой невысокий процент DCF-меченых клеток не может служить адекватным показателем состояния их АОС.

Также, при анализе цитограммы данных клеток видно, что происходит смещение всех популяций в сторону увеличения флуоресценции DCF (рис. 4), что может свидетельствовать о возможном развитии в данных условиях окислительного стресса.

Самые низкие показатели количества DCF-меченых клеток наблюдались в пробах, выделенных с использованием фиколла и замороженных под защитой криопротекторов различного механизма действия. Так, после криоконсервирования ЯСК, замороженных с ПЭО, количество клеток с высокой продукцией АФК снижалось в среднем на 7%, а после криоконсервирования с ДМСО – практически не изменялось по сравнению с показателями до замораживания (табл.). При детальном анализе состояния данных клеток очевидно, что, как и в случае замораживания ЯСК только под защитой высокомолекулярного полиглюкина, низкие показатели продукции АФК не могут свидетельствовать о полноценной работе АОС клеток, поскольку при данных методах криоконсервирования, кроме большой потери количества клеток (30-40%), происходит существенное снижение их жизнеспособности (на 39-48%), как было показано нами ранее (Бабийчук Л.А., 2011). При этом стоит отметить, что даже этот невысокий процент DCF-меченых клеток в пробе полностью приходится на популяцию мононуклеаров, из которых и состоит данный концентрат ЯСК 2.

**ЯСК 1 + ДМСО** **ЯСК 1**

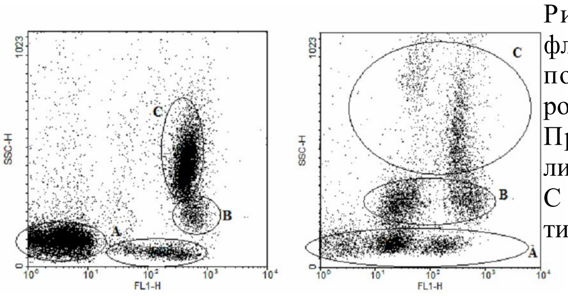



Рис. 4. Цитограмма флуоресценции DCF ЯСК после криоконсервирования.
Примечание: А – лимфоциты, В – моноциты, С – гранулоциты. Данные типичного эксперимента.

Таким образом, проведенная оценка продукции АФК ядросодержащими клетками кордовой крови в зависимости от метода криоконсервирования показала преимущества применения методов выделения ЯСК с использованием полиглюкина и двухэтапного центрифугирования с последующим их криоконсервированием под защитой соответствующих криопротекторов. Показано, что повышенная продукция АФК клетками может рассматриваться как нормальный ответ клеток на воздействие факторов криоконсервирования. При этом, чтобы продукция АФК клетками могла показать истинную картину состояния их АОС, данный показатель с должен рассматриваться в комплексе с другими характеристиками клеток, такими как сохранность, жизнеспособность и состояние их плазматической мембраны.

**Литература**

1. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса. Вопросы медицинской химии. 2001, 6, 561-581

2. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. // Соросовский Образовательный Журнал. 2001, 7(6), 4-10.

3. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol Today. 1994, 15(1), 7-10.

4. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. Biochem Mol Med. 1996, 59(2), 93-7.

5. Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Гуріна Т.М., Рязанцев В. В., Зубова О.Л. та Зубов П.М. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові. Україна. Патент 23499 МПК С 12 N 5/00. 25.05.2007.

6. Bцyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 1968, 97, 31-50.

7. Бабийчук Л. А., Грищенко В. И., Рязанцев В. В., Зубов П.М. та Тимченко О.Л. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека. Укр. журнал гематологии и трансфузиологии. 2005, 4(д), 122-123.

8. 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, 130(4), 1910–7.

9. Дамбаева С.В., Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека. Иммунология. 2001, 6, 58–61.

10. Edwards S.W., Moulding D.A., Derouet M., Moots R.J. Regulation of neutrophil apoptosis. Chem Immunol Allergy. 2003, 83, 204-24.

11. Бабийчук Л.А., Михайлова О.А., Зубов П.М., Рязанцев В.В. Оценка состояния различных популяций ядросодержащих клеток кордовой и донорской крови в зависимости от метода их криоконсервирования. Проблемы криобиологии. 2011, 21(4), 385-394.

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ РАЗНЫХ СРОКОВ ГЕСТАЦИИ**

**Останков М.В., Бондарович Н.А., Кузняков А.В., Леонова Л.А., Гольцев А.Н.**

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

E-mail: Cryopato@rambler.ru

Криобиологические технологии, направленные на модификацию структурно-функционального статуса биообъекта, в том числе клеток фетальной печени (КФП) являются важнейшим компонентом применения клеточной и тканевой терапии в клинической практике. Эффективность трансплантации КФП обусловлена присутствием в них широкого спектра клеточных популяций, среди которых ключевую роль играют стволовые кроветворные элементы (Грищенко В.И., 2002, Ciriza J., 2013). Способность КФП корригировать не только гемопоэтическую, но и иммунокомпетентную систему организма реципиента делает их весьма привлекательными при лечении патологий аутоиммунного генеза, в том числе и онкопатологии. Необходимо обратить внимание на то, что гемопоэтические предшественники КФП существенно меняют свой структурно-функциональный статус на различных этапах гестационного периода (Morrison S.J., 1995), вследствие чего они будут по-разному отвечать на условия криоконсервирования, что может влиять на их противоопухолевый эффект при превентивном использовании.

Цель исследования – изучить влияние условий криоконсервирования на структуру и функцию КФП 15 и 19 суток гестации (КФП-15 и КФП-19), а также оценить проявляемый клетками лечебный эффект.

**Материалы и мето**ды. Исследовали КФП эмбрионов мышей линии C57BL 15 и 19 суток гестации. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (2004 г., Киев). Клетки фетальной печени выделяли щадящей гомогенизацией с добавлением раствора криопротектора ДМСО в концентрации 7, 10, 12,5% и экспозиции с ним в течение 5 мин, затем их криоконсервировали на замораживателе УОП-06 по программам:

I – $1^0$C/мин до $-25^0$C; погружение в жидкий азот (двухэтапная) (2 Гольцев А.Н., 1997);

II – $1^0$С/мин до –$40^0$С; $10^0$С/мин до –$90^0$С; погружение в жидкий азот (трехэтапная) (Шерешков С.И., 1984);

III – $1^0$С/мин до –$25^0$С, выдержка 10 мин; $10^0$С/мин до –$40^0$С; погружение в жидкий азот (четырехэтапная) (Вотякова И.А.).

Сохранность КФП и содержание популяции $CD34^+CD38^-$ клеток определяли на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, США), используя пропидий йодид (PI) и МАТ к CD34- и CD38- структурам (БД, США) ( Шторх В., 1987). Все контрольные показатели были приняты за 100%.

Лечебный эффект оценивали по степени изменения частоты развития рака молочной железы и выживаемости мышей-самок линии С3Н в 13 и 16 месяцев, которым превентивно в 6 месяцев были введены внутривенно КФП-15 и КФП-19 в дозе $1x10^6$ и $5x10^6$ соответственно.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы Excel.

**Результаты и обсуждение.** В процессе эмбрионального развития перераспределяется клеточная популяция фетальной печени. При сравнительном исследовании морфологического состава КФП-15 и КФП-19 в исходном материале наблюдали увеличение количества зрелых гепатоцитов и бластов на фоне снижения общего пула СКК ($CD34^+CD38^-$ клеток), что обусловило разную чувствительность клеток 15 и 19 суток гестации к условиям криоконсервирования.

При замораживании КФП-15 с 10% ДМСО по программе I сохранность клеток составила 87%, а относительное содержание $CD34^+CD38^-$ клеток повышалось до 116% в сравнении с контролем (рис. 1а). Указанная концентрация криопротектора также обеспечивала сохранность клеток всех ростков кроветворения. Несколько уступали этим данным результаты, полученные после криоконсервирования КФП по программе II с 7,5 % ДМСО (рис. 1б). При изучении клеточного состава образцов, замороженных по данной программе, при всех концентрациях криопротектора наблюдали их обогащение недифференцированными формами бластных клеток, нормобластами. При снижении концентрации криопротектора до 7,5 % в пределах программы III отмечали низкую сохранность клеток при большом количестве клеток $CD34^+CD38^-$, превосходивших таковое в интактной суспензии КФП (рис. 1 в), что можно рассматривать как частный случай особой способности менее коммитированных клеток избегать повреждения (Humpe A., 2005, Tanimura A, 2014). В клеточном составе наблюдали повышение содержания неидентифицируемых бластных клеток, эритробластов при 7,5 и 10% ДМСО и увеличение содержания нормобластов при 12,5% ДМСО. Разная криорезистентность популяций клеток при определенных концентрациях

ДМСО может быть обусловлена различной пластичностью мембран, состоянием ферментных систем, способностью выдерживать деформационные напряжения.

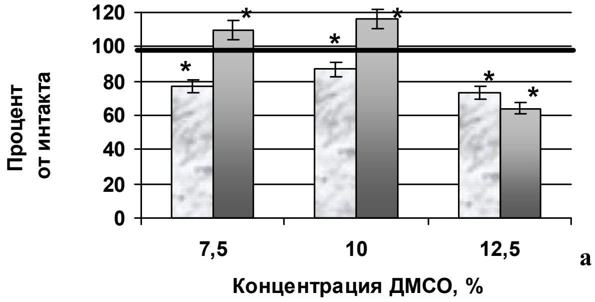



Рис.1.Содержание сохранных и $CD34^{+}CD38^{-}$ КФП-15 после криоконсервирования по I (а).

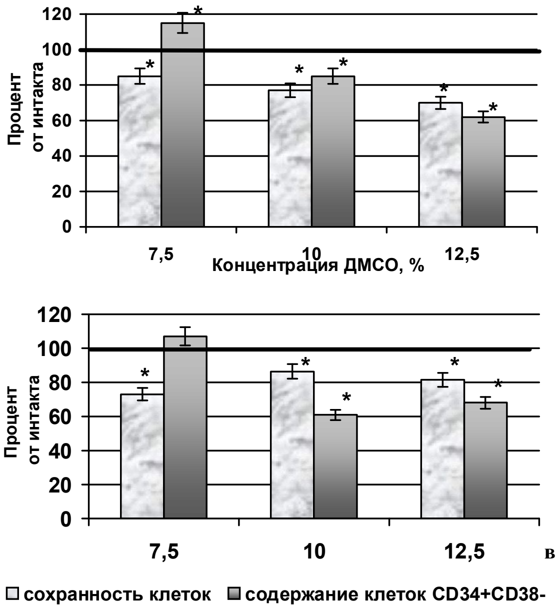



Рис.1.Содержание сохранных и $CD34^{+}CD38^{-}$ КФП-15 после криоконсервирования по II (б) и III (в) программам.

Примечания: за 100% приняты значения интактных КФП; *-$p<0,05$ по отношению к интактным клеткам

При криоконсервировании КФП более поздних сроков гестации был выявлен иной характер реализации криозащитного действия концентрации ДМСО. Наибольшее количество сохранных и $CD34^{+}CD38^{-}$ клеток среди КФП-19 (рис. 2 а), близкое к значениям интактной суспензии соотношение клеток отмечали при программе II с 12,5% ДМСО, менее «эффективной» была программа III при 12,5% ДМСО, продемонстрировавшая высокие значения жизнеспособности и содержания $CD34^{+}CD38^{-}$ клеток (рис. 2 б), а также сохранности бластных форм клеток и нормобластов. Присутствие в криоконсервирующей среде 7,5 и 10% ДМСО при программе I обеспечивало относительно высокие соотношения значений сохранности и содержания клеток $CD34^{+}CD38^{-}$ (рис. 2 в). В клеточном составе при всех концентрациях ДМСО в пределах программы I отмечали обогащение популяции бластными формами клеток, сохранность гепатоцитов.

Таким образом, различия в чувствительности к криоповреждениям КФП 15 и 19 суток гестации определяют результат их криоконсервирования. Следует отметить, что значения сохранных КФП-19 при каждом режиме были ниже КФП-15, что согласуется с данными (Anderson E.M., 1996) и может быть связано с более выраженным адаптивным эффектом различных компенсаторных механизмов КФП-15.

Полученные результаты указывают на то, что в цикле замораживания-отогрева изменяется криопротекторное действие 3-х выбранных концентраций ДМСО от скорости замораживания и исходного состояния биообъекта, т.е. сроков гестации КФП.

Очевидно, реализация функции криоконсервированного материала в условиях in vivo является единственным показателем оценки состоятельности трансплантируемого биообъекта. В связи с этим в сравнительном аспекте был исследован терапевтический эффект КФП-15, замороженных по программе I под защитой 10% ДМСО, и КФП-19, криоконсервированных по программе II при 12,5 % ДМСО.

Манифестация опухолевого процесса у самок линии C3H начинается с 13 - месячного возраста и наблюдается у 78,6% животных, к 16 месяцам этот показатель возрастает до 90%, при этом более 70% животных погибает. Превентивная терапия КФП снижала частоту возникновения опухолей, повышая выживаемость животных в 16 месяцев. При этом эффект проведенной терапии зависел от сроков гестации криоконсервированных КФП (ККФП). После применения ККФП-15 частота развития рака молочной железы в 13 месяцев снизилась до 44,2%, а до 16 месяцев доживало 55,8%, что в 4 раза превышает этот показатель в группе животных, которых не лечили. При введении ККФП-19 частота развития была выше (57,3%), что приводило к снижению количества выживших животных (до 42,7%) в 16 месяцев. У выживших животных, вне зависимости от сроков гестации вводимого материала, развитие рака молочной железы не было отмечено.

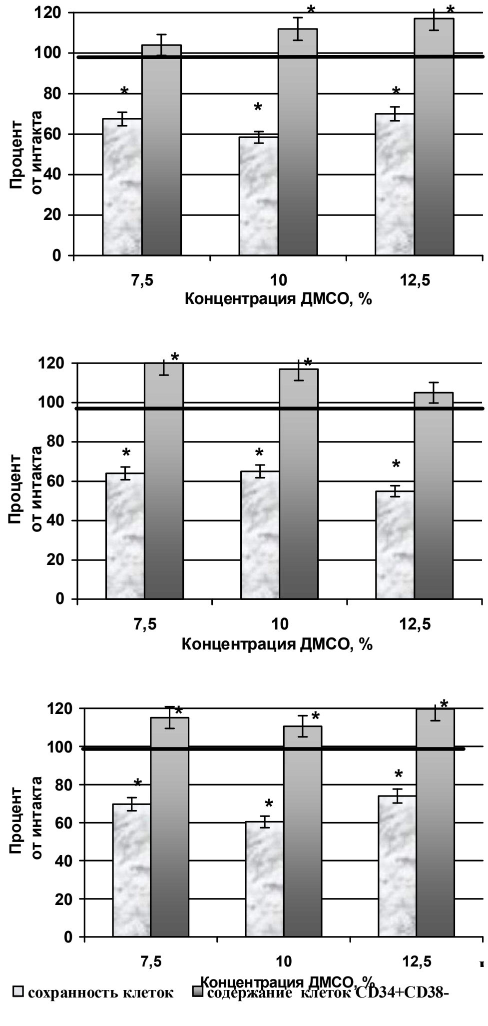



Рис. 2. Содержание сохранных и $CD34^{+}CD38^{-}$ КФП-19 после криоконсервирования по II (а), III (б) и I (в) программе.

Примечание: за 100% приняты значения интактных КФП; *-$p<0,05$ по отношению к интактным клеткам

Полученные результаты свидетельствуют о преимуществах использования в онкологической практике ККФП, находящихся на более ранних сроках гестации.

**Выводы.** Показано, что для КФП-15 наиболее эффективной является программа замораживания I под защитой 10% ДМСО, а для КФП-19 –

программа II при 12,5 % ДМСО. Это свидетельствует о необходимости оценки исходного морфофункционального состояния КФП, определяемого сроками гестации для поиска оптимального режима их криоконсервирования. При этом отмечено наличие особенностей модифицирующего влияния холода на разные популяции клеток.

Выявлено, что превентивный лечебный эффект при детерминированном раке молочной железы в большей степени реализуют ККФП-15, что выражалось большей выживаемостью животных и меньшей частотой развития рака молочной железы по сравнению с введением ККФП-19.

**Литература**

1. Вотякова И.А. Влияние факторов низкотемпературного криоконсервирования на биологическую полноценность гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Автореф. дис. … канд. мед. наук, Харьков, 1987. 35 с.

2. Гольцев А.Н. Изучение патофизиологических механизмов проявления иммунореактивности гемопоэтической ткани // Пробл. криобиологии. 1997. №1-2. С.37-41.

3. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии. 2002. №1. С. 54–84

4. Шерешков С.И., Буачидзе Л.Н., Баранов А.Е. и др. Трансплантация клеток фетальной печени от многих эмбрионов больным гемобластозами, кондиционированным общим облучением и химиопрепаратами // Гематология и трансфузиология. 1984. Т. 29, №4. С. 9-15.

5. Шторх В., Эммрех И. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммунофлюоресценции. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина , 1987. С. 254-268.

6. Anderson E.M., Jones D.R., Liu D.T., Evans A.A. Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal hematopoietic progenitor cell preparations // Fetal Diagn. Ther. 1996. Vol.11, №6. P.427-432.

7. Ciriza J., Thompson H., Petrosian R., et al. The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: lessons learned and possible clinical applications // Exp. Hematol. 2013. Vol.41, №5. P.411-423

8. Humpe A., Beck C., Schoch R. et al. Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34+ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining // Transfusion. 2005. Vol.45, №7. P.1208-1213.

9. Morrison S.J., Hemmati H.D., Wandycz A.M., Weissman I.L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol.92, №22. P.10302-10306.

10. Tanimura A, Shibayama H, Hamanaka Y, et al. An anti-apoptotic molecule Anamorsin is essential for both development and /or maintenance of hematopoietic stem cells and microenvironments to support fetal liver hematopoiesis // Exp. Hematol. 2014 Jan 15. [Epub ahead of print]

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРЕНОВ НА СПЕРМИИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

**Павлович Е.В., Гапон А.А.**

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

E-mail: lenoni@mail.ru

**РЕЗЮМЕ.** В связи с тем, что показатель подвижности сперматозоидов имеет большое значение в области вспомогательных репродуктивных технологий, предпринимаются попытки его повышения с помощью различных физических факторов. В работе исследованы особенности действия фуллеренов на подвижность, целостность мембраны и состояние хроматина спермиев человека после криоконсервирования.

Установлено, что криоконсервирование спермиев при нормо- и астенозооспермии в присутствии фуллеренов в концентрациях 10 и 20 мкг/мл приводит к росту подвижности спермиев. Активационное действие низких концентраций УНЧ может быть связано с усилением функциональной активности митохондрий. Углеродные наночастицы в концентрациях 10 и 20 мкг/мл не вызывают изменений жизнеспособности спермиев человека и состояния ядерного хроматина при нормо- и астенозооспермии до и после криоконсервирования - отогрева. Цитотоксическое действие фуллеренов проявляется при росте их концентрации в среде криоконсервирования спермиев до 30-40 мкг/мл. Высокие концентрации фуллеренов при добавлении к среде криоконсервирования снижают показатель подвижности спермиев после отогрева.

В настоящее время в различных областях биологии и медицины находят широкое применение наноразмерные материалы. Значительное место среди наноматериалов занимают наноуглеродных структуры, к которым относят фуллерены и нанотрубки. Углеродные наночастицы (УНЧ) инертны, имеют развитую поверхность и пористость, характеризуются высокой химической и механической стабильностью, электропроводностью. Актуальными и дискуссионными являются вопросы биосовместимости, наличия/отсутствия токсичности углеродных наносоединений. По данным литературы УНЧ, а именно фуллерены, обладают антиоксидантным (Wang I.C. et al., 1999), противовирусным (Меджидова М.Г. и др., 2004), антибластомной (Венгерович Н.Г. и др., 2011), антимикробным действием (Tsao N. et al., 2002) и фотодинамической активностью (Vileno B., 2004), и являются перспективным материалом для создания новых высокотехнологичных медицинских материалов и лекарственных препаратов. Ряд авторов отмечают отсутствие как острого, так и хронического токсического воздействия УНЧ на организм при различных способах введения, другие, наоборот, в своих работах указывают на выраженные токсические эффекты УНЧ на клетки кожи человека и головного мозга рыб (Monteiller C. et al., 2007). Не менее остро стоит вопрос возможности накопления УНЧ в тканях печени и селезенки при внутривенном введении (Фатхутдинова Л. М. и др., 2009).

В связи с развитием новых вспомогательных репродуктивных технологий актуальным является совершенствование способов криоконсервирования спермы человека для лечения бесплодия. Инкубация с углеродными наносоединениями может быть применена как один из методов повышения качества эякулята до и после криоконсервирования. Повышение процента подвижных и функционально активных спермиев человека является весьма важным в случае астенозооспермии, когда показатель подвижности спермиев до и после криоконсервирования - отогрева значительно ниже, чем при нормоспермии. Наряду с этим углеродные наночастицы могут также оказывать токсическое действие и вызывать нарушения генетического аппарата сперматозоидов. В связи с вышесказанным, проведение детальных исследований с учетом показателя подвижности, нарушений целостности мембраны и организации хроматина необходимо перед дальнейшим использованием образцов спермиев после инкубации с углеродными наносоединениями (Чорнокульский І. С. и др., 2009, Laberge R.M. et al., 2005, Henkel R. et al., 2003).

Влияние углеродных наночастиц на репродуктивную систему человека, а именно на спермии, окончательно не выяснено. Использование углеродных наночастиц для увеличения подвижности сперматозоидов до и после криоконсервирования может быть одним из путей улучшения состояния спермы человека. Цель работы - исследование влияния углеродных наночастиц на морфо-функциональное состояние спермиев человека после криоконсервирования.

**Материалы и методы.** В работе исследовали образцы эякулятов мужчин-доноров в возрасте от 20 до 40 лет при нормо- и астенозооспермии. Оценку эякулята проводили согласно рекомендациям ВОЗ (World Health Organization, 2010). Эякулят собирали методом мастурбации в стерильные чашки Петри или бюксы. Затем эякулят помещали в термостат (35-37°С) на 40-60 мин. В образцах спермы визуально оценивали количество спермиев с быстрым и медленным прямолинейным движением (фракция а + в), оценивая показатель подвижности (Брагина Е.Е. и др., 2002). Концентрацию и подвижность спермиев определяли под световым микроскопом МБИ 15-У.

В работе в качестве УНЧ использовали концентрированный водный раствор гидратированного С60. Гидратированный фуллерен С60 (C60HyFn) представляет собой молекулярно-коллоидную систему сферических фрактальных кластеров, структурной единицей которых является высокогидрофильный комплекс, состоящий из молекулы фуллерена С60, покрытой гидратной оболочкой, содержащей 24 молекулы воды. Размер наносоединения C60HyFn составляет 1,6-1,8 нм. Кластеры (вторичные ассоциаты) C60HyFn образуются путем слияния их гидратных оболочек (Prilutski Yu.I. et al., 1999, Buzaneva E. et al., 1999).

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали в мазках, окрашенных эозином - нигрозином. Для определения жизнеспособности спермиев равные объемы красителя и суспензии спермиев, перемешивали и переносили на обезжиренное предметное стекло, делали мазок, высушивали и исследовали под световым микроскопом с применением иммерсии. Определяли процентное соотношение живых и мертвых спермиев, используя тот факт, что в препарате головки живых спермиев бесцветные, а головки мертвых окрашиваются эозином в розовый цвет. Жизнеспособность и состояние хроматина (тест 7AAD) определяли после инкубации с УНЧ.

В качестве криозащитной среды использовали 4% глицерин (Merck, Германия) и 20 % БСА (РАА, Австрия) на растворе Хенкса (РАА, Австрия). К образцам добавляли УНЧ в исследованных концентрациях до криоконсервирования - отогрева. Криоконсервирование проводили в условиях криохранилища. Охлаждение проводили со скоростью 1 град/мин до -70°С в парах жидкого азота в условиях криохранилища в течении 30 минут с последующим погружением в жидкий азот. Образцы хранили в течение 2-х месяцев в условиях низкотемпературного банка. Отогрев осуществляли на водяной бане при 37°С до появления жидкой фазы.

Методом ФАКС-анализа на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton-Dickinson, США) исследовали процессы деконденсации ядерного хроматина в спермиях с помощью красителя 7AAD (Sigma). Проникающий краситель 7- аминоактиномицин D (7AAD) связывается с нуклеиновыми кислотами. 7AAD присуща флюоресценция в красной области спектра. Окрашивание осуществляли по стандартной методике фирмы производителя (Schmid I. et al., 1992). Результаты анализировали с помощью программы Win MDI v.2.8. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью Microsoft Office Excel 2007.

**Результаты и обсуждение.** Исследования проводились на образцах, которые при оценке по критериям ВОЗ (World Health Organization, 2010) соответствовали нормо- и астенозооспермии. О сохранности морфофункционального состояния сперматозоидов судили по показателям подвижности, целостности мембраны и состояния хроматина.

Раннее проведенные исследования на образцах спермиев до криоконсервирования при нормо- и астенозооспермии показали, что инкубация с УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл в течение 1 часа вызывает повышение числа активно-подвижных спермиев и не приводит к изменениям в целостности мембраны головки спермиев в случае и нормо- и астенозооспермии. Задачей данного исследования было изучить действие фуллеренов на состояние спермиев человека после криоконсервирования.

Полученные данные по определению процента жизнеспособных сперматозоидов с неповрежденной мембраной после криоконсервирования-отогрева в присутствии УНЧ представлены на рис. 1. Жизнеспособность сперматозоидов (окраска эозином- нигрозином) при нормоспермии после криоконсервирования-отогрева составляла в контроле 95,5 ± 2,3 %, при астенозооспермии - 68,5 ± 2,2 %.

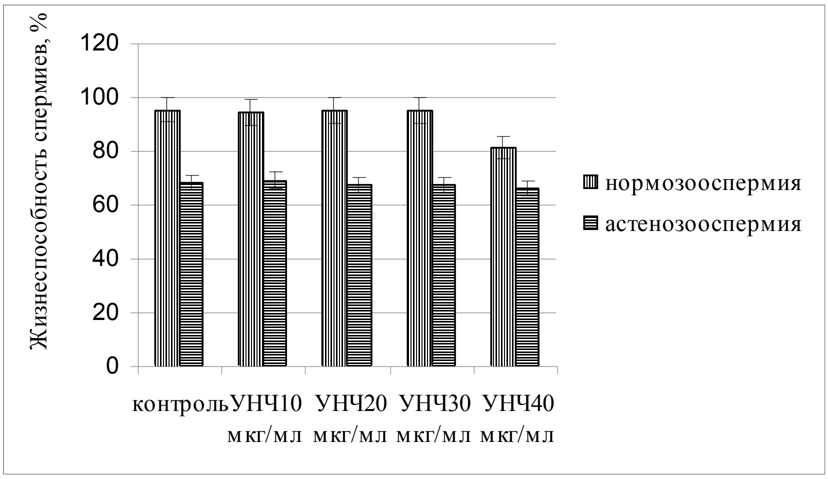



Рис. 1. Жизнеспособность спермиев человека после криоконсервирования в присутствии УНЧ.

УНЧ в концентрациях 10-30 мкг/мл не оказывали существенного влияния на показатель жизнеспособности спермиев при нормо- и астенозооспермии. При нормо- и астенозооспермии жизнеспособность спермиев в присутствии УНЧ в концентрации 40 мкг/мл снижалась относительно контроля на 14,3 и 2,5 % соответственно. Следует отметить, что УНЧ в высоких концентрациях значительно сильнее влияют на состояние мембран спермиев при нормоспермии, чем при патоспермии.

Также был оценен показатель подвижности спермиев после криоконсервирования в присутствии УНЧ при нормо- и астенозооспермии (рис. 2), так как именно криоконсервированные образцы спермиев требуют повышения качества и функциональной активности.

Добавление к среде криоконсервирования спермиев при нормоспермии УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл приводило к росту подвижности спермиев относительно контроля на 1,9 и 8,1 %. В случае нормоспермии УНЧ в концентрациях 30 и 40 мкг/мл оказывали ингибирующее действие на подвижность спермиев после криоконсервирования-отогрева. С ростом концентрации наночастиц степень снижения подвижности спермиев росла (падение процента подвижных спермиев на 15,3 и 29,7 % относительно контроля). Эта тенденция влияния наночастиц сохранялась для спермиев и в случае астенозооспермии. Криоконсервирование с углеродными наночастицами в концентрациях 10 и 20 мкг/мл вызвало повышение процента подвижных спермиев фракции «а + в» в 1,45 и 1,33 раза (на 5,4 и 4,0% относительно контроля). Высокие концентрации УНЧ, придававшие к среде криоконсервирования, снижали показатель подвижность спермиев после отогрева при астенозооспермии на 3,3 и 7,4 %.

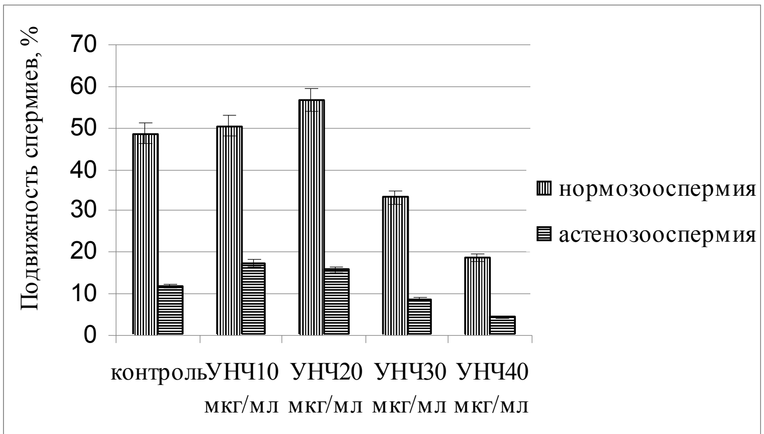



Рис. 2 . Подвижность спермиев человека после криоконсервирования в присутствии УНЧ.

Методом проточной цитофлуориметрии были проведены исследования влияния УНЧ на состояние нуклеарного хроматина спермиев до и после криоконсервирования-отогрева с использованием зонда 7AAD (Schmid I. et al., 1992). 7AAD связывается с двухцепочечной ДНК между парами оснований в GC - богатых регионах, возбуждается при 488 нм аргоновым лазером эмиссия наблюдается при длине волны 647 нм. Оценка состояния нуклеарного хроматина и целостность мембран - это качественный показатель оплодотворяющей способности нативных и криоконсервированных спермиев человека. Конденсированное состояние хроматина на заключительных стадиях дифференцировки очень важно для дальнейшего функционирования сперматозоида. Очевидно, что нарушение запрограммированной структурной перестройки хроматина сперматозоида может привести к образованию дефектного мужского пронуклеуса и негативно повлиять на ранние стадии эмбриогенеза (Воробьева О. и др., 1998, Hernandez-Ochoa I. et al., 2006).

Полученные результаты по определению процента 7AAD+ спермиев до и после криоконсервирования-отогрева при нормоспермии представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1.

Влияние УНЧ в исследуемых концентрациях на процент $7AAD^-/7AAD^+$ спермиев при нормоспермии, % (n=10, M±m)

| Образец | $7AAD^-$, % | $7AAD^+$, % |
|---|---|---|
| Контроль | 97,6±0,3 | 2,4±0,5 |
| УНЧ 10 мкг/мл | 97,1±0,4 | 2,9±0,5 |
| УНЧ 20 мкг/мл | 98,3±0,5 | 1,7±0,6 |
| УНЧ 30 мкг/мл | 94,8±0,3* | 5,2±0,5* |
| УНЧ 40 мкг/мл | 94,2±0,5* | 5,8±0,5* |

Примечание**:** Здесь и в таблицах 2,3,4. $7AAD^-$ - спермии с конденсированным хроматином, $7AAD^+$ - спермии с деконденсированным хроматином. *- достоверно относительно контрольных значений, $p<0,05$.

Количество спермиев с конденсированным хроматином ($7AAD^-$) при нормоспермии составило 97,6±0,3%. Этот показатель оставался в пределах контрольных значений при криоконсервировании с УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл. Однако при введении УНЧ в концентрациях 30 и 40 мкг/мл наблюдалось достоверное увеличение $7AAD^+$ спермиев относительно данного показателя в группе контроля на 2,8 та 3,4%.

После криоконсервирования - отогрева количество $7AAD^-$ спермиев при нормоспермии составляло 95,1 ± 0,3%. Действие углеродных наночастиц на спермии вызывало снижение показателя $7AAD^-$ спермиев и этот эффект возрастал с ростом концентрации УНЧ.

Таблица 2.

Влияние УНЧ в исследуемых концентрациях на процент $7AAD^-/7AAD^+$ спермиев после криоконсервирования - отогрева при нормоспермии, % (n=10, M±m)

| Образец | $7AAD^-$, % | $7AAD^+$, % |
|---|---|---|
| Контроль | 95,1±0,3 | 4,9±0,4 |
| УНЧ 10 мкг/мл | 94,6±0,4 | 5,4±0,5 |
| УНЧ 20 мкг/мл | 93,9±0,5* | 6,1±0,4* |
| УНЧ 30 мкг/мл | 86,8±0,3* | 13,2±0,3* |
| УНЧ 40 мкг/мл | 87,2±0,5* | 12,8±0,4* |

Показатель $7AAD^-$ спермиев при астенозооспермии до и после криоконсервирования - отогрева составлял соответственно 94,2 и 90,5 % (табл. 3 и 4). Достоверное увеличение процента $7AAD^+$ спермиев (с деконденсированным хроматином) наблюдалось в нативных образцах при инкубации с УНЧ в концентрациях 30 и 40 мкг/мл (табл. 3). Показатель оставался в пределах контрольных значений при применении УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл.

Таблица 3.

Влияние УНЧ в исследуемых концентрациях на процент $7AAD^-/7AAD^+$ спермиев при астенозооспермии, % (n=10, M±m)

| Образец | $7AAD^-$, % | $7AAD^+$, % |
|---|---|---|
| Контроль | 94,2±0,5 | 5,8±0,3 |
| УНЧ 10 мкг/мл | 93,9±0,6 | 6,1±0,2 |
| УНЧ 20 мкг/мл | 94,5±0,5 | 5,5±0,3 |
| УНЧ 30 мкг/мл | 92,8±0,5* | 7,2±0,4* |
| УНЧ 40 мкг/мл | 92,1±0,4* | 7,9±0,4* |

Таблица 4.

Влияние УНЧ в исследуемых концентрациях на процент $7AAD^-$/ $7AAD^+$ спермиев после криоконсервирования-отогрева при астенозооспермии, % (n=10, M±m)

| Образец | $7AAD^-$, % | $7AAD^+$, % |
|---|---|---|
| Контроль | 90,5±0,4 | 9,5±0,3 |
| УНЧ 10 мкг/мл | 89,4±0,4 | 10,6±0,4 |
| УНЧ 20 мкг/мл | 89,5±0,5 | 10,5±0,5 |
| УНЧ 30 мкг/мл | 86,7±0,3* | 13,3±0,4* |
| УНЧ 40 мкг/мл | 87,1±0,5* | 12,9±0,4* |

Фуллерены в концентрациях 30 и 40 мкг/мл снижали количество $7AAD^-$спермиев при астенозооспермии после криоконсервирования-отогрева. Действие УНЧ на состояние хроматина и мембран спермиев становилось заметнее с ростом концентрации УНЧ (табл. 4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл не вызывало активации процессов деконденсации хроматина в спермиях до и после криоконсервирования-отогрева в условиях нормо- и астенозооспермии. Увеличение процента $7AAD^{+}$ спермиев (спермиев с деконденсированным хроматином) наблюдалось при нормоспермии и астенозооспермии при концентрации УНЧ 30 и 40 мкг/мл.

Таким образом было установлено, что криоконсервирование спермиев при нормо- и астенозооспермии с УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл приводит к росту подвижности спермиев относительно контроля. Высокие концентрации УНЧ при добавлении к среде криоконсервирования снижают показатель подвижности спермиев после отогрева. Активационное действие низких концентраций УНЧ может быть связано с усилением функциональной активности митохондрий. Также по данным авторов (Иванов Л.В. и др., 2009) углеродные наночастицы могут подавлять процесс перекисного окисления липидов и играть роль цитосорбентов. Дальнейший рост концентрации углеродных наносоединений оказывает цитотоксическое действие на сперматозоиды человека.

Анализ полученных результатов показал, что УНЧ в концентрациях 10 и 20 мкг/мл не вызывают изменений жизнеспособности спермиев человека и состояния ядерного хроматина при нормо- и астенозооспермии до и после криоконсервирования - отогрева. Цитотоксическое действие фуллеренов проявляется при росте их концентрации в среде криоконсервирования спермиев до 30-40 мкг/мл.

**Литература**

1. Wang I.C., Tai L.A., Lee D.D. et al. C60 and water–soluble fullerene derivatives as antioxidants against radicalinitiated lipid peroxidation // J. Med. Chem. 1999. Vol. 42. P. 4614-4620.

2. Меджидова М.Г., Абдуллаева М.В., Федорова Н.Е. и др. Противовирусная активность аминокислотных производных фуллерена при цитомегаловирусной инфекции in vitro// Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т.49, № 8- 9.С. 13-20.

3. Венгерович Н.Г., Тюнин М.А., Антоненкова Е.В. и др. Биологическая активность нанобиокомпозитов фуллерена С60 // Иммунология. 2011. Т. 12, №1. С.161-177.

4. Tsao N., Luh T.Y., Chou C.K. In vitro action of carboxyfullerene // J. Antimicrobal Chemother. 2002. Vol.49. P. 641-649.

5. Vileno B. In vitro assa of singlet oxygen generation in the presence of water–soluble derivatives of C60 // Carbon. 2004.Vol. 42. P. 1195-1198.

6. Monteiller C., Tran L., MacNee W. et al. The proinflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area // Occup. Environ. Med. 2007. Vol. 64, № 9. P. 609-615.

7. Фатхутдинова Л. М., Халиуллин Т. О., Залялов Р. Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казанский мед. ж. 2009. №4. С.578-584.

8. Чорнокульский І. С., Бойко М.І. Теорії пошкодження нуклеарної ДНК людських сперматозоїдів // Клінічна та експериментальна патологія. 2009. Т. 7, №4 (30). С.121-124.

9. Laberge R.M., Boissonneault G. Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete // Arch Androl. 2005. T. 51, №2. P. 125– 133.

10. Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M. et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology // Reprod. Biomed. Online. 2003. № 7. P. 477 – 484.

11. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition / World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 2010. P.287.

12. Брагина Е.Е., Абдумаликова Р.А. Руководство по сперматологии / / М: СОРЕК-полиграфия.2002. 93 с.

13. Prilutski Yu.I., Durov S.S., Yashchuk V.N. et al. Theoretical predictions and experimental studies of self-organization C60 nanoparticles in water solution and on the support // Eur.Phys.J. 1999. Vol. 9. P. 341 – 343.

14. Buzaneva E., Gorchinskyi A., Benilov A. et al. Self-formation of nanostructures from hadrated aggregates and nanocrystals of $(C_{60})_N$ molecules on the liquid crystals layer // Electronic Properties of Novel Materials - Progress in Molecular Nanostructures, XIII International Winterschool, AIP Conference Proceedings. Kirchberg. Tyrol, Austria. 1999. P. 200 – 204.

15. Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart Ch. et al. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry // Cytometry. 1992. Vol. 13, № 2. P. 204 – 208.

16. Воробьева О., Филатов М., Леонтьева О., Семенова Е. Влияние степени компактизации хроматина ядер сперматозоидов на развитие эмбрионов человека // Проблемы репродукции. 1998. Т. 4, № 1. С. 14 – 18.

17. Hernandez-Ochoa I., Sanchez-Gutierrez M., Solis-Heredia M.J., Quintanilla-Vega B. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation // Reproductive Toxicology. 2006. Vol. 21. P. 171 – 178.

18. Иванов Л.В., Крамар М.И., Черных В.П. и др. Активирующее действие углеродных нанотрубок на сперматозоиды // Поверхность. 2009. Вып. 1(16). С. 314 – 321.

## КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

**Павлович Е.В., Волкова Н.А., Гольцев А.Н.**

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

E-mail: lenoni@mail.ru

**РЕЗЮМЕ.** Проведена оценка влияния разных концентраций наночастиц золота (НЧЗ) при добавлении в среду криоконсервирования на состояние клеток культуры фибробластов человека. После криоконсервирования-отогрева в клетках культуры фибробластов человека оценивали динамику роста и процессы апоптоза/некроза. Результаты, полученные методами проточной цитофлуориметрии свидетельствуют о том, что использование НЧЗ в концентрациях 1.5 и 3 мкг/мл не приводило к развитию процессов апоптоза и некроза в клетках при культивировании в течение 7 суток. Криоконсервирование в присутствии НЧЗ в концентрации 6 мкг/мл, с последующем культивированием свидетельствовало о снижении процента жизнеспособных клеток и росте числа клеток в состоянии апоптоза.

Для развития современных направлений биотехнологии и медицины необходима разработка оптимальных способов длительного хранения клеточных линий различной этиологии. Для обеспечения максимальной сохранности клеточных культур разработано большое количество протоколов криоконсервирования, учитывающих индивидуальные особенности различных типов клеток. Однако даже при оптимальных условиях после криоконсервирования-отогрева в клетках обнаруживаются повреждения, которые существенно снижают биологические свойства клеточных культур. Актуальным является поиск методов, способных активировать восстановительные процессы в клетках после криоконсервирования. Благодаря своей уникальной структуре и свойствам наночастицы золота могут быть применены в широком спектре биологических и биомедицинских исследований (Дыкман Л. А. и др., 2011, BarathManiKanth S. et al., 2010). Одним из перспективных направлений является использование НЧЗ как стимуляторов пролиферации клеточных культур. Целью работы было исследование морфо-функционального состояния культуры клеток фибробластов человека (КФЧ) после криоконсервирования в присутствии НЧЗ.

**Материалы и методы.** В работе исследовали культуры КФЧ после криоконсервирования-отогрева. Средой криоконсервирования была ростовая среда с добавлением 25 % эмбриональной сыворотки (HyClone) и 10 % ДМСО и НЧЗ в концентрациях 1.5, 3 и 6 мкг/мл.

Наночастицы золота были получены цитратным методом синтеза (Дыкман Л. А. и др., 2008). В работе были использованы раствор НЧЗ, исходная концентрация которого по металлу составляла 45 мкг/мл. Средний размер НЧЗ составлял 15 нм.

Криоконсервирование проводили в условиях криохранилища. Охлаждение образцов проводилось от 25 до 4єС с последующим охлаждением до -70є С в парах жидкого азота в течение 30 минут. Последним этапом охлаждения проводили погружение в жидкий азот (-196є С). Образцы хранились в условиях низкотемпературного банка в течение 2-х недель. Отогрев осуществляли на водяной бане при 40°C до появления жидкой фазы. После отогрева клеточную суспензию однократно отмывали от криопротектора при добавлении раствора Хэнкса в соотношении 1:9 с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин.

КФЧ культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с 10 % FCS (v/v) производства HyClone с добавлением пенициллина/стрептомицина (PAA, Австрия) и амфотерицин B (5 мкг/мл) (PAA, Австрия) по методике (Van Sprang P.A. et al, 2001). Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева общепринятым способом (А.К.Гулевский и др., 2010). Культивирование проводили в условиях стерильного боксового помещения в инкубаторе Sanyo при 37°C с 5 % содержанием $CO_2$ во влажной атмосфере (Фрешни Р., 1989). Для перевода клеток в суспензионное состояние монослой обрабатывали смесью 0.02% раствора Версена (ГУП ИПВЕ им. М.П.Чумакова РАМН) и 0.25% раствора трипсина (PAA, Австрия) в соотношении 4:1. При культивировании плотность посева клеток составляла $1.2*10^4$ клеток на $см^2$. Смена питательной среды происходила каждые 3 суток. При культивировании КФЧ изучали динамику пролиферации клеток (Волкова Н.О., 2012, Hayflick L. et al, 1961). Для определения прироста количества клеток в КФЧ в контроле и в присутствии НЧЗ подсчитывали количество клеток на сроках 3, 5, 7 суток путем ферментативного снятия с пластика. Контролем были КФЧ криоконсервированные без НЧЗ и соответствующие нативные культуры.

Методом проточной цитофлуориметрии исследовали апоптотические и некротические процессы в клетках КФЧ при воздействии наночастиц золота. Изучение процессов некроза-апоптоза проводили с помощью красителей Annexin -V- FITC (Annexin V) (BD), 7-Amino-Actinomycin (7AAD) (BD) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton-Dickinson). 7AAD был использован для определения жизнеспособных/некротических клеток. Результаты анализировали с помощью программы Win MDI v.2.8. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью Microsoft Office Excel 2007 и t-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании динамики роста в течение 7 суток было показано, что после криоконсервирования в клетках КФЧ наблюдали снижение пролиферации в 1,8 раза (в контрольных образцах до и после криоконсервирования данный показатель составлял $4.9*10^5$ и $2.8*10^5$ клеток на $см^2$ соответственно). При всех исследуемых концентрациях НЧЗ клетки фибробластов после криоконсервирования-отогрева адгезировали к культуральному пластику и имели фибробластоподобную морфологию. Прирост клеток КФЧ в присутствии наночастиц во всех исследованных концентрациях имел схожий характер (рис.). Использование НЧЗ в концентрациях 1.5, 3 и 6 мкг/мл при криоконсервировании не приводило к достоверным изменениям в пролиферативных характеристиках КФЧ.

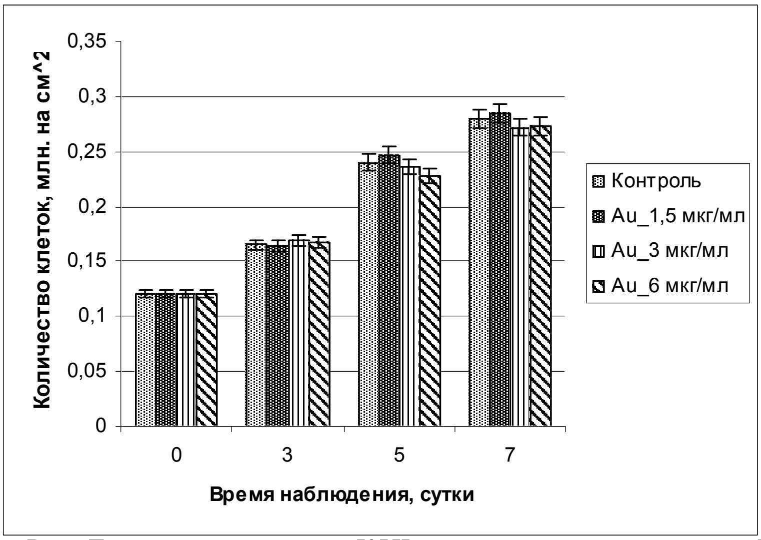



Рис. Динамика роста клеток КФЧ после криоконсервирования с НЧЗ исследуемых концентраций

К задачам данного исследования относится отслеживание появления апоптотических и некротических процессов в клетках КФЧ под влиянием наночастиц золота. Как показано (Gopinath P. et al, 2008, Kim K. et al, 2006, Maynard A.D. et al, 2006), наночастицы металлов могут вызывать апоптоз в клетках различного происхождения. Для решения вопроса о состоянии процессов апоптоза/некроза после криоконсервирования в присутствии НЧЗ оценивали состояние клеток на 7 сутки культивирования (табл.).

Таблица.

Цитофлуориметрический анализ клеток криоконсервированных с НЧЗ на 7 сутки культивирования, окраска Annexin V и 7AAD

| Образец/регион | Annexin $V^+$ /$7AAD^-$ | Annexin $V^-$ /$7AAD^-$ | Annexin $V^+$ /$7AAD^+$+Annexin $V^-$ /$7AAD^+$ |
|---|---|---|---|
| Контроль | 2.2±0.5 | 92.5±1.0 | 5.3±0.2 |
| Au_1,5 мкг/мл | 1.5±0.6 | 92.6±1.1 | 5.9±0.1 |
| Au_3 мкг/мл | 2.3±0.7 | 92.1±1.3 | 5.6±0.1 |
| Au_6 мкг/мл | 6.3±0.6* | 87.8±1.2* | 5.9±0.2 |

*- достоверно относительно контрольных значений, p<0,05.

Культивирование в течение 7 суток КФЧ после криоконсервирования с НЧЗ в концентрации 6 мкг/мл сопровождалось снижением процента жизнеспособных клеток на 4.7±1.1%, а так же увеличением на 4.1±0.5% числа клеток на ранней стадии апоптоза относительно контрольных образцов.

При помощи проточной цитофлуориметрии показано, что криоконсервирование и последующее культивирование фибробластов с НЧЗ в концентрациях 1.5 и 3 мкг/мл в течение 7 суток не влечет усиление процессов апоптоза и некроза в клетках. При криоконсервировании КФЧ с наночастицами золота в концентрации 1.5, 3 и 6 мкг/мл при дальнейшем культивировании показатель пролиферативной активности клеток КФЧ не отличается от контроля на всех сроках наблюдения. В апоптотической клетке фосфатидилсерин перемещается со стороны цитоплазмы на внешнюю часть бислоя, в результате чего происходит активация каскада каспаз, конденсация хроматина, нарушение электронно-транспортной цепи в митохондриях и в итоге прекращения синтеза АТФ. Поэтому мы рекомендуем при криоконсервировании КФЧ не использовать наночастицы золота в концентрации, превышающей 3 мкг/мл.

Таким образом было установлено, что криоконсервирование фибробластов с наночастицами золота в концентрациях 1.5 и 3 мкг/мл не приводит к развитию процессов некроза и апоптоза в клетках при дальнейшем культивировании. При применении наночастиц золота в концентрации 6 мкг/мл происходит снижение процента жизнеспособных клеток и рост числа клеток на ранней стадии апоптоза.

**Литература**

1. Волкова Н.О. Дослідження морфофункціональних характеристик кріоконсервованих культур клітин стромального походження // Проблемы криобиологии. 2012. Т.22, №2. С.118-125.

2. А.К.Гулевский, А.В.Трифонова, Т.Ф.Петренко. Восстановление криоконсервированных культур клеток в регенерационных средах, содержащих низкомолекулярную фракцию кордовой крови // Біотехнологія. 2010. Т.3, №1. С.52-57.

3. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение.Москва: Наука, 2008. 319 с.

4. Дыкман Л. А., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы// Acta Naturae. 2011. Т. 3, № 2. С. 36– 59.

5. Культура животных клеток. Методы. Под ред. Р. Фрешни. Москва: Мир, 1989. 333 с.

6. BarathManiKanth S., Kalishwaralal K., Sriram M., et al. Antioxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice / / J. Nanobiotechnol. 2010. Vol. 8, № 16. doi: 10.1186/1477-3155-8-16.

7. Gopinath P., Gogoi S.K., Chattopadhyay A. Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy // Nanotechnology.2008.Vol. 19, № 7 doi:10.1088/0957-4484/19/7/075104.

8. Hayflick L, Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains //Exp Cell Res. 1961.Vol. 25, №12. P.585-621.

9. Kim K., Lee M., Park H. Cell-permeable and biocompatible polymeric nanoparticles for apoptosis imaging // J Am Chem Soc. 2006. Vol. 22, № 11. P. 3490-3491.

10. Maynard A.D., Aitken R.J., Butz T., et al. Safe handling of nanotechnology // Nature.2006. Vol. 444, № 7117. P.267-279.

11. Van Sprang P.A., Janssen C.R. Toxicity identification of metals: development of toxicity identification fingerprints //Environmental Toxicology and Chemistry.2001.Vol. 20, № 11. P. 2604–2610.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ SPLIT ICSI У ПАЦИЕНТОВ С ОЛИГОАСТЕНОТЕРАТОЗООСПЕРМИЕЙ.

**Петрушко М.П., Пиняев В.И., Подуфалий В.В., Ревенко Е.Б.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины, г. Харьков, Украина.*
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Проблема бесплодия, рассматриваемая в рамках физиологии и патологии репродуктивной функции человека, имеет не только медицинское, но и огромное социально-демографическое значение. В настоящее время от бесплодия страдают 15–20% супружеских пар (*Померанцева Е.И. и др.,* 2001, *Стрижаков А.Н.* и др., 2000]. На долю мужского бесплодия приходится до 40 % случаев (Абоян И.А. и др., 2012 Виноградов И.В. и др., 2009, Rebar R.W., 2009).

Немаловажную роль в лечении бесплодия занимает репродуктивная криобиология, благодаря которой появилась возможность накопления и сохранения генетического материала супружеской пары в криобанках. В практике вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) повседневно используются методы криоконсервирования сперматозоидов человека. По данным ВОЗ, качество спермы у мужчин ухудшается из года в год, что требует разработки новых, более простых, но эффективных методов криоконсервирования. С другой стороны, необходимы методы, которые позволили бы повысить качество замороженно-оттаянной спермы.

Несмотря на многолетние исследования, на сегодняшний день нет ни одного способа криоконсервирования, позволяющего обеспечить 100% сохранность спермиев после замораживания-отогрева (Morris G.J. et al., 1999). Темпы восстановления нелетальных криоповреждений сперматозоидов имеют прямую зависимость от предварительного качества данного биологического материала и существенно зависят от исходной концентрации клеток в замораживаемой пробе (Deborah Montagnini, M.S., 2006). Высокоэффективные методы криоконсервирования, разработанные для нормоспермических эякулятов, невозможно использовать в том случае, когда в эякуляте содержатся лишь единичные клетки, не только ввиду сложности их обнаружения для проведения оплодотворения in vitro. Как правило, эякуляты с низкой концентрацией гамет, плохо переносят криоконсервирование. Предложенная ранее методика криоконсервирования с накоплением единичных сперматозоидов и последующим применением их для искусственной инсеминации или при проведении рутинного ЭКО показала очень низкую эффективность (Паращук Ю.С., 1994).

Прорывом в лечении бесплодия, обусловленного мужским фактором, стало ICSI, поскольку с его появлением отпала необходимость криоконсервировать большое количество эякулята, а замораживание небольшого количества сперматозоидов при ультравысоких скоростях позволила получать хорошие результаты при размораживании и добиться почти 100% выживаемости. Авторами (Roca J., 2006) было показано, что концентрирование спермиев перед замораживанием может увеличивать сохранность их оплодотворяющей способности.

**Материалы и методы.** Для криоконсервирования спермиев использовали двухэтапный метод замораживания. Для этого к суспензии клеток добавляли криозащитную среду (Sperm Freezing Solution, Cook, Австралия) в соотношении 1:1. Состав криозащитной среды: 15% глицерол, хлорид натрия, хлорид калия, сульфат магния, фосфат натрия, бикарбонат натрия, глюкоза, лактат кальция, глицин, сахароза, HEPES-буфер, 20% сывороточный альбумин человека.

После 10 минут эквилибрации дозы помещали в пластиковые пайеты «Nunc» объемом 1 мл или в микрокапилляры объемом 20 мкл. Для криоконсервирования использовали программный замораживатель. Образцы охлаждали в программируемом замораживателе от 22$^{o}$C до -35$^{o}$C со скоростью 1$^{o}$C/мин, от -35 до -196$^{o}$C со скоростью 1500$^{o}$C/мин.

Размораживание образцов проводили на водяной бане при 37°C в течение 10 минут до полного исчезновения твердой фазы. После отогрева образцы спермы отмывали от криопротектора в среде Sperm preparation medium (Cook, Австралия) и проводили оценку жизнеспособности спермиев (окраска эозином-нигрозином).

**Интрацитоплазматическая инъекция единичного спермия в ооцит (ICSI).** В каплю культуральной среды в чашке Петри с диаметром 30 мм под слоем минерального масла помещали денудированные ооциты. Проводили визуальную оценку морфологии и степень зрелости ооцита. Сперматозоид вводили только в полностью дозревшие ооциты, находящиеся в метафазе II деления мейоза.

На первом этапе производили иммобилизацию сперматозоида при помощи микроиглы. Это достигалось путём неполного перетирания его хвоста о дно чашки Петри. Затем сперматозоид помещали в микропипетку при помощи отрицательного давления таким образом, чтобы в пипетку первым зашёл хвост сперматозоида. Установив объектив микроманипулятора на оолемму ооцита, опускали холдинговую и инъекционную пипетки в фокальную площадь ооцита. Ориентацию ооцита производили таким образом, чтобы полярное тело находилось строго на 12 часов. Осуществляли инъекцию сперматозоида, прокалывая прозрачную оболочку ооцита в позиции 3-х часов. Во время микроинъекции визуально оценивали качество цитоплазмы ооцита (по цвету, наличию грануляций или вакуолей) и сопротивлению ооплазмы проколу.

Контроль оплодотворения ооцита осуществляли через 16 ч после инсеминации под инвертированным микроскопом Olympus IX-71. Учитывали количество пронуклеусов. При нормальном оплодотворении в ооплазме зиготы визуализировали два пронуклеуса.

Эмбрионы культивировали в среде Cleavage Medium, Cook (Австралия) в течении 5 суток. Показатель формирования бластоцист рассчитывали как отношение эмбрионов, сформировавших бластоцисты, к общему числу полученных в данной группе эмбрионов. Бластоцисты классифицировали по Gardner D.K., 2002.

Для переноса эмбрионов в полость матки заполняли стерильный шприц объемом 1 мл средой для культивирования. Из стерильного пакета извлекали катетер для переноса эмбрионов (Bourn - Wallace; HG Wallace Ltd) и присоединяли к нему шприц со средой. Несколько раз, промыв средой полость катетера, втягивали небольшой пузырек воздуха в конец катетера, после чего набирали эмбрионы в 10 мкл среды и, затем снова набирали небольшой пузырек воздуха для маркирования положения эмбрионов в катетере. Пользуясь наружным футляром, как стабилизатором, осторожно вводили катетер через канал шейки матки в полость и производили трансплантацию эмбрионов. Контроль эффективности переноса эмбрионов осуществляли микроскопическим исследованием оставшейся в катетере среды.

Было проведено 47 циклов оплодотворения. Каждый из образцов сперматозоидов был разделен на 2 равные части. Ооциты пациенток были разделены на 2 группы. Первую группу ооцитов оплодотворяли путем накопления спермиев из деконсервированных образцов с последующим добавлением 0,1 млн активноподвижных спермиев к ооцитам. Вторую группу ооцитов оплодотворяли также деконсервированными спермиями с помощью технологии ICSI, для чего из активноподвижной фракции деконсервированных спермиев выделяли единичный морфологически нормальный спермий, который инъецировали в ооплазму ооцита.

**Результаты и обсуждения.** Результаты исследований показали, что частота оплодотворения в первой группе составила 25,3%, во-второй - 92% (табл.).

В группе ICSI достоверно реже регистрировался блок развития эмбрионов на стадии 2-х и 8-бластомеров.

Общеизвестно, что у человека экспрессия эмбрионального генома начинается с 8-ми клеточной стадии, поэтому, эмбрионы при культивировании in vitro, чаще всего останавливают свое развитие на этой стадии (Tesaric Y., 2002). Механизм, лежащий в основе этого явления, неизвестен. Блок развития во время активации эмбрионального генома связан, скорее всего, с блоком транскрипции и трансляции, замедлением метаболизма эмбрионов (Niakan K. et al, 2012).

Обращает на себя внимание, что в группе 2 качество эмбрионов, культивируемых in vitro, было выше, чем в группе 1. Очевидно, за тот период, когда ооциты находятся в среде, содержащей спермии, происходит нарушение развития эмбрионов, которые выражаются в образовании цитоплазматических фрагментов (рис.).

Таблица.

Параметры циклов ЭКО и ICSI при использовании криоконсервированных спермиев.

| Исследуемые параметры | Группа 1 | Группа 2 |
|---|---|---|
| Количество ооцитов, аб. | 150 | 150 |
| Среднее количество ооцитов на пациентку (M±m) | 3,75±0,8 | 3,75±0,7 |
| Количество зигот (аб.) | 38 | 138 |
| Частота оплодотворения, (%) | 25,3 | 92 |
| 2- клеточный блок (аб.) | 12 (31,6%) | 1 (0,7%) |
| Эмбрионы на стадии 4-бластомеров (аб.) | 8 (21,1%) | 127 (92,0%) |
| Эмбионы с фрагментацией более 25% на стадии 4-бластомеров (аб.) | 18 (47,3) | 10 (7,3%) |
| 8-клеточный блок (аб.) | 6 (23,1%) | 4 (2,9%) |
| Эмбрионы на стадии 8-бластомеров (аб.) | 6 (23,1%) | 101 (73,7%) |
| Эмбионы с фрагментацией более 25% на стадии 8-бластомеров (аб.) | 14 (53,8%) | 26 (18,9%) |
| Эмбрионы, достигнувшие стадии бластоцисты (аб.) | 5 (25%) | 69 (54,3%) |

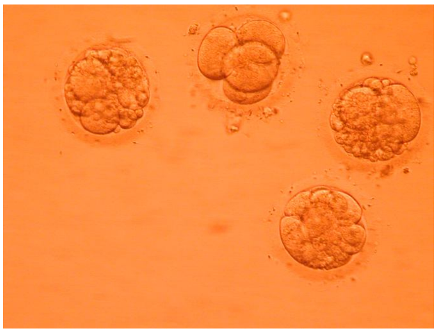


Рис. 1. Эмбрионы с фрагментацией цитоплазматических фрагментов. Нативный препарат. X 400.

Границей считается 25% фрагментация: если фрагментов меньше, то у эмбриона есть шансы на имплантацию и дальнейшее развитие. При повышении порога, в большинстве случаев, эмбрион погибает, поскольку вместо того, чтобы увеличивать свои размеры при каждом последующем дроблении, эмбрион отсеивает половину своих бластомеров.

В настоящее время нет однозначного мнения о жизнеспособности таких эмбрионов. Так, некоторые авторы настаивают на выборе клеток оптимального качества, другие, ссылаясь на то, что эмбрионы до 8-клеточной стадии развития являются тотипотентными, считают не обязательным учет степени их фрагментации (Giorgetti C. et al, 1995, Steer C. et al, 1992).

Причины фрагментации эмбрионов различны – генетические аномалии ооцитов, сперматозоидов и самих эмбрионов. В последнее время считают, что фрагментация цитоплазматических участков является свидетельством апоптоза клетки (Van Royen E. et al, 1999). Подтверждением этому служит ряд работ по изучению хромосомного баланса фрагментированных эмбрионов. Показано, что более 30 % таких эмбрионов несут те или иные хромосомные аномалии: мозаицизм встречается в 19,8 % клеток, а полиплоидия в 5,5 %. Хромосомные аномалии встречаются в 2 раза чаще, чем у эмбрионов с нормальной морфологией (Claman P. et al., 1998).

По данным многих исследователей частота формирования бластоцисты составляет порядка 30-40% (Devreker F. et al, 2000). В нашем исследовании эмбрионы, полученные в ходе проведения программы ICSI, достоверно чаще развивались до стадии бластоцисты, чем эмбрионы после ЭКО. Это может быть связано с негативным влиянием продуктов жизнедеятельности спермиев, находившихся в системе культивирования ооцитов in vitro на протяжении 18 часов.

Таким образом, в результате проведенной работы, можно сделать вывод о предпочтительном использовании технологии ICSI у пациентов с олигоастенотератозооспермией, по сравнению с рутинным ЭКО, путем криоконсервирования накопления и спермиев. В пользу этого вывода свидетельствует более высокая частота оплодотворения, лучшее качество эмбрионов и высокая частота развития эмбрионов до стадии бластоцисты в группе с применением ICSI.

**Литература**

1. Померанцева Е.И., Козлова А.Ю., Супряга О.М. // Проблемы репродукции. 2001. № 2. С. 58–66.

2. Стрижаков А.Н. и др. Избранные лекции по акушерству и гинекологии. М., Феникс. 2000.

3. Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S.et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics // Hum Reprod Update. 2010. № 16. C. 231.

4. Абоян И.А., Грачев С.В., Павлов С.В. и др. Структура и корреляция мужского бесплодия // Материалы 8-го Конгресса «Мужское здоровье». 2012 г. С. 10.

5. Виноградов И.В., Блохин А.В, Афанасьева Л.М. и др. Опыт применения L-карнитина в лечении секреторного бесплодия // Андрол и генит хир. 2009. № 2. С. 19–23.

6. Rebar R.W. Medical therapy for idiopathic male infertility // Journal Watch General Medicine. 2009.

7. Тер-Аванесов Г.В. Андрологические аспекты бесплодного брака. Дис. … докт. мед. наук. М., 2002. 302 с.

8. Morris G.J., Acton E., Avery S., Morris G.J., et al. A novel approach to sperm cryopreservation // Human Reproduction. 1999. №. 14. P. 1013-1021.

9. Thais Serzedello de Paula M.S., Ricardo Pimenta Bertolla, D.V.M., Deborah Montagnini, M.S. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia // Fertility and Sterility. 2006. Vol. 86. № 3. P. 597-600.

10. Паращук Ю.С. Бесплодие в браке. К., Здоровье. 1994. 202 с.

11 Roca J., Hernбndez M., Carvajal G. Factors influencing boar sperm cryosurvival // J ANIM SCI. 2006. Vol. 84. №. 10. P. 2692–2699.

12. Gardner D.K., Lane M., Schoolcraft W.B. Physiology and culture of the human blastocyst // J Reprod Immunol. 2002. Vol. 55. № 1-2. P. 85–100.

13. Tesaric Y., Mendoza C., Graco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human .preimplantation development after ICSI // Hum Rep. 2002. Vol. 17. № 1. P. 184–189.

14. Terada Y., Luetjens C.M., Sutovsky P., Schatten G. Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? // Fertil. Steril. 2000. Vol. 74. №3. P. 454–460.

15. Niakan K. , Han J., Pedersen R. Human pre-implantation embryo development // Development. 2012. Vol. 139. № 2. P. 829–841

16. Giorgetti C., Terriou P., Auquier P. et al. Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfer // Hum. Reprod. 1995. Vol. 10. № 9. P. 2427-2431.

17. Steer C., Mills C., Tan S. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in

an in-vitro fertilization and embryo transfer programme // Hum. Reprod. 1992. Vol.7. №1. P. 117–119.

18. Van Royen E., Mangelschots K., de Neubourg D. et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer // Hum. Reprod. 1999. Vol. 14. №9. P. 2345–2349.

19. Claman P., Armant D.R., Seibel M.M. et al. The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies // J. In Vitro Fertil. Embryo Transf. 1987. Vol. 4. № 4. P. 218–222.

20. Devreker F., Englert Y. In vitro development and metabolism of the human embryo up to blastocyst stage // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2000. Vol. 92. №1. P. 51–56.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЕЙ *SACCHAROMYCESCEREVISIAE,* ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В АЛЬГИНАТНОМ ГЕЛЕ

**Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Онасенко Е.С., Зубов П.М.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*
E-mail: viktoriia-may@mail.ru

В последнее десятилетие одним из приоритетных направлений является использование иммобилизованных микроорганизмов в различных биотехнологических процессах. В связи с этим приобрела актуальность проблема разработки технологий долгосрочного хранения иммобилизованных микроорганизмов, в том числе и криоконсервирование. Принимая во внимание многочисленные теоретические и экспериментальные данные о выраженности различных повреждающих физико-химических факторов при криоконсервировании клеточных суспензий, целью данного исследования было изучение сохранности функциональной активности криоконсервированных клеток дрожжей *S.cerevisiae,* иммобилизованных в альгинатном геле.

**Материалы и методы**. Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomycescerevisiae*(раса получена из РНИИ хлебопекарской промышленности, г. Санкт – Петербург). Иммобилизацию клеток в геле альгината натрия проводили по методу, предложенному в(Синицын А.П.,1994). Для анализа биологических свойств криоконсервированных клеток дрожжей были взяты 4 группы экспериментальных образцов: 1 –

суспензия клеток в дистиллированной воде; 2 – клетки, иммобилизованные в альгинатных гранулах; 3 – суспензия клеток в 5% растворе ДМСО; 4 – клетки, инкубированные в течение 15 мин в 5% растворе ДМСО с последующей иммобилизацией в гранулах альгината натрия. Образцы охлаждали со скоростью 1°С/мин до -40°С, а затем погружали в жидкий азот. Оценку ферментативной активности дрожжей определяли по подъемной силе (Зверева Л.Ф.,1983), мальтазной и зимазной активности (Новаковская С.С., 1980).

Изучение дыхательной активности клеток проводили методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием спиновых зондов. В качестве спинового зонда использовали растворимый зонд ТЕМПОН (2,2,6,6-тетра-метил-4-оксопиперидин-1-оксил) фирмы Aldrich.

Для определения содержания активных форм кислорода (АФК) в клетках *S.cerevisiae*после консервированияиспользовали метод проточнойцитофлуориметрии. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, USA), с использованием 2,7- дихлородигидрофлюорисцеиндиацетата ($DCFH_2$ – DA) фирмы Aldrich. Определяли процент клеток с высокой интенсивностью флуоресценции DCF ($DCF^{high}$) (LupettiA.,2002). Анализ данных, полученных методом проточнойцитофлуориметрии, проводили с использованием программного обеспечения WinMDI 2.8.

**Результаты исследования.** Эффективный протокол криоконсервирования клеток должен обеспечивать сохранение их функциональных свойств, в частности, ферментативной активности. Для изучения ферментативной активности дрожжей *S.cerevisiae* после замораживания нами была определена подъемная сила, зимазная и мальтазная активность. Эти показатели очень важны для полноценной характеристики сохранности дрожжей.

Полученные нами результаты, представленные в таблице, свидетельствуют об отсутствии влияния процесса криоконсервирования на исследуемый генетически детерминированный спектр сахаролитических свойств дрожжей. Газообразование регистрировали во всех исследуемых образцах. Однако следует отметить, что при замораживании свободные клетки, как более незащищенные, получали большую степень криоповреждений. Летальные повреждения снижали процент жизнеспособных клеток в этих образцах. Нелетальные, возникающие на разных этапах криоконсервирования и последующего возврата к нормотермии, проявлялись в качестве нарушения функциональной активности и в обратимом ингибировании процессов метаболизма. Они приводили к задержке синтеза и как следствие, к снижению количества сахаролитических ферментов. Об этом свидетельствуют показатели ферментативной активности свободных клеток после криоконсервирования. Разница ферментативной активности иммобилизованных клеток от контрольных образцов была незначительной. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, опубликованными разными авторами по характеристикам иммобилизованных дрожжей. Высокая ферментативная активность дрожжей объясняется тем, что в иммобилизованных клетках увеличивается в 2-3 раза количество гексокиназы и других ферментов основного метаболизма. Это приводит к ускорению процессов брожения за счет увеличения скорости потребления субстрата (глюкозы, мальтазы) и меньшую остаточную концентрацию их в среде под конец процесса брожения в сравнении со свободными клетками (Ефременко Е.Н., 2009).

Таблица.

Физико-химические показатели ферментативной активности дрожжей после криоконсервирования

| Условия эксперимента | Наименование показателя | | |
|---|---|---|---|
| | Подъемная сила, мин | Зимазная активность, мин | Мальтазная активность, мин |
| Суспензия клеток | 73±1,5* | 65±3,4* | 105±3,8* |
| Иммобилизованныеклетки | 63±1,8 | 51±2,6 | 96±1,8* |
| $К_с$до замораживания | 58±1,3 | 39±3,9 | 72±2,6 |
| $К_{им}$до замораживания | 55±1,1 | 40±2,7 | 80±1,5 |

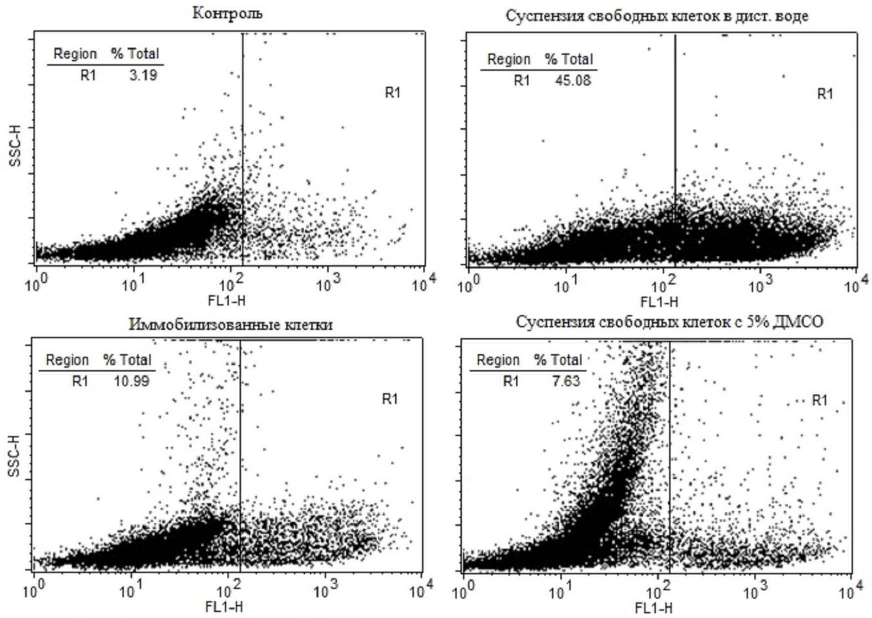
Примечание: * –различия статистически достоверны ($p< 0,05$) по отношению к контролю

Учитывая то, что оценка ферментативной активности не дает полной картины физиологического состояния клеток после криоконсервирования, мы сочли необходимым исследовать дыхательную активность клеток. Известно, что одним из ведущих механизмов возникновения летальных повреждений в ходе криоконсервирования дрожжевых клеток, культивируемых в аэробных условиях, являются именно повреждение митохондриальных структур клеток и свойств электронно-транспортной цепи (Нардид О.А.,2009).

В ходе исследования методом ЭПР было установлено, что степень ингибирования восстановления спинового зонда, соответственно, и активность дыхательной цепи митохондрий в образцах иммобилизованных клеток после криоконсервирования достоверно не отличалась от аналогичных показателей нативных клеток. Активация энергетического метаболизма, вероятно, связана с усилением митохондриогенеза в иммобилизованных клеткахдрожжей (Саришвили Н.Г.,2000). Необходимо отметить, что с одной стороны, активно дышащие клетки дрожжей

*S.cerevisiae* более устойчивы к действию низких температур, с другой – усиление дыхательной активности связано с усилением генерации АФК. Известно, что одной из причин гибели клеток при замораживании может быть окислительный стресс, в результате которого происходит накопление в клетках высокой концентрации АФК, которая, как известно, может повреждать различные клеточные структуры (ДНК, белки и различные мембранне структуры).

Поэтому несомненный интерес представляет изучение содержания АФК в криоконсервированных клетках, для определения степени влияния их на повреждения клеток в процессе криоконсервирования. Результаты, полученные в данном исследовании методом проточной цитофлуориметрии, приведены на рисунке.



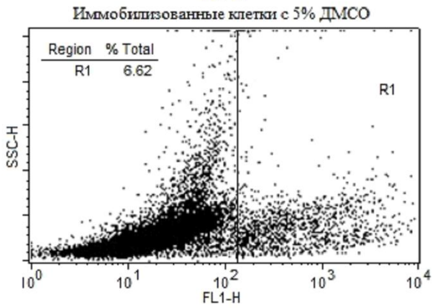




Рис. 1 – Содержание АФК в клетках дрожжей *S.cerevisiae* после замораживания с различными условиями (окрашивание клеток флуоресцентным красителем DCF)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальное количество клеток с высокой интенсивностью флуоресценции DCF былов первой экспериментальной группе (суспензия клеток, замороженная в дист. воде). Наличие клеток с высокой концентрацией АФК в этой группе было в 14 раз больше, чем в контрольных образцах и в 4 раза больше, чем в образцах второй экспериментальной группы (иммобилизованные клетки). Количество клеток с высокой концентрацией АФК в образцах 2 группы было в 3,5 раза больше, чем в контрольных образцах. Снижение концентрации АФК в клетках 3 и 4 экспериментальной группы, возможно, было связано с наличием криопротектора ДМСО, входящего в состав криозащитной среды.

Как видно из представленного рисунка, количество клеток DCF$^{high}$в криоконсервированных образцах варьирует в зависимости от условий замораживания. Самый высокий показатель жизнеспособности был в клетках второй экспериментальной группы. Хотя содержание АФК в клетках этой группы было выше, чем в 3 и 4 группе. Объяснение этому несколько противоречивому факту мы видим в следующем. Известно, что стрессовая реакция клетки, инициируемая процессом иммобилизации, сопровождается повышением генерации активных форм кислорода (RogerD., 1996). Содержание концентрации АФК в клетках может повышаться под влиянием различных негативных воздействий, к числу которых можно отнести как иммобилизацию, так и факторы криоконсервирования.Клетка постоянно инактивирует активные формы кислорода, состоящие из свободных радикалов, которые можно ликвидировать одним путем – спариванием, добавлением или отнятием у него одного электрона. Согласно литературным данным характерной особенностью реакций рекомбинаций радикалов является освобождение значительных квантов энергии (SenC.K., 2003). Мы полагаем, что активация метаболической активности иммобилизованных клеток происходит за счет энергии, освобождаемой при многочисленных реакциях рекомбинаций радикалов в результате их превращений в устойчивые молекулы.

Метаболическая и митохондриальная активность иммобилизованных клеток может существенно влиять на степень сохранности их в процессе криоконсервирования. Об этом свидетельствуют полученные ранее нами результаты (Пономарева В.Л., 2012) Анализируя результаты в этом исследовании, мы смогли дополнить наши объяснения того, что предварительная экспозиция клеток с криопротектором ДМСО с последующей иммобилизацией дополнительного защитного эффекта не оказывала. Очевидно, что иммобилизация в альгинатном геле инициирует процесс генерации АФК,влекущих за собой усиление метаболической активности. Это обеспечило суммарный защитный эффект при замораживании, который был выше, чем защитное действие ДМСО на фоне снижения содержания АФК в клетках.

Полученные в данном исследовании результаты, свидетельствуют о преимуществе криоконсервированияклеток в иммобилизованном состоянии, обеспечивающим высокую степень сохранности жизнеспособности и функциональной активности клеток микроорганизмов.

**Выводы:**

1. Ферментативная активность иммобилизованных дрожжей была значительно выше, чем свободных в суспензии клеток по всем физико-химическим показателям.

2. Иммобилизация в геле альгината натрия обеспечивает сохранность показателей дыхательной активности клеток *S.cerevisiae* в процессе криоконсервирования на исходном уровне, что связано с активацией энергетического метаболизма.

3.Усиление метаболической активности иммобилизованных клеток связано с генерацией активных форм кислорода при стрессовой реакции, инициируемой иммобилизацией.

4. Высокая метаболическая и митохондриальная активность, является одним из факторов, обеспечивающим высокую степень сохранности клеток *S.cerevisiae*, иммобилизованных в альгинатном геле.

**Литература**

1. Синицын А.П. Райнина Е.И., Лозинский В.И, Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М.: МГУ, 1994. С. 162.

2. Технология и технохимический контроль хлебопекарного производства / под ред. Л.Ф.Зверевой, З.С.Немцовой, Н.П.Волковой. Изд. 3-е. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. С.215.

3. Справочник по производству хлебопекарских дрожжей / под ред. С.С. Новаковской, Ю.И. Шишацкого. М.: Пищевая промышленность, 1980. С. 217– 218.

4. Lupetti A., PaulusmaAnnema A., Senesi S., Campa M., Dissel J. T. van, Nibbering P. H. Internal thiols and reactive oxygen species in Candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferri // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002. Vol. 46, No. 6. P. 1634–1639.

5. Ефременко Е.Н. Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты: диссертация доктора биологических наук: 03. 00. 02./ Ефременко Елена Николаевна; (место защиты:Институт биохимической физики РАН) Москва, 2009, 433с: 71 10 – 3/156

6. Нардид О.А. Исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий методом ЭПР спинового зонда // Проблемы криобиологии. 2009. Т. 19, № 2. С. 177–185.

7. Саришвили Н.Г. Микробиологические основы технологии шампанских вин. М.: Пищевая промышленность, 2000.364с.

8. Roger, D., David A., David H. Immobilization of flax protoplasts in agarose and alginate beads // Plan Physiology .1996. Vol. 112. P. 1191– 1199.

9. Sen C.K. The general case for redox control of wound repair // Wound Repair and Regeneration. 2003. Vol. 11. P. 431 – 438.

10. Пономарева В.Л. Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С., Пишко О.В. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей Saccharomyces cerevisiae, иммобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології і медицини. 2012. Вип.2, Т.1 (92) . С. 14–17.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ SACCHAROMYCES CEREVISIDAE С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КСЕНОНА

**Пульвер А. Ю., Целиковский А. В., Пульвер Н. А., Артюхов И. В., Перегудов А. Г.**

*НТЦ криобиологии и анабиоза, Москва, Россия*

*Кафедра инфекционных болезней ВГМА им. Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия*

E-mail: scidep@ntckba.ru

**Введение.** Внимание к газовым кристаллогидратам (клатратам) не ослабевает со времен первоначального определения их структуры (Claussen 1951; Stackelberg and Mьller 1951). Клатраты природного газа – главный источник проблем в газовых трубопроводах (Sloan 2003) и в то же время - самый богатый на Земле источник ископаемого углеводородного топлива (Boswell 2009), играющий значительную роль в глобальных климатических изменениях (Kaiho, Arinobu et al. 1996; Sloan 2003).

До сих пор не опровергнута молекулярная теория общего наркоза (Pauling 1961), постулирующая, что газовые анестетики в силу липофильности концентрируются в клеточных мембранах нейронов, разобщая их взаимодействие за счет образования там кристаллогидратов, меняющих свойства синаптических мембран. Являясь сильнейшим и практически соответствующим представлениям анестезиологов об «идеальном газовом анестетике» ингаляционным наркозным средством (Hecker, Baumert et al. 2004), ксенон разрешен к применению в качестве такового на территории России и Германии. Помимо этого он используется в лечении наркомании и алкоголизма, так как является антагонистом NMDA-рецепторов (Kornetov, Shpisman et al. 2002), а самое главное – в качестве нейропротектора при реперфузионно-ишемическом синдроме различной локализации (особенно при инсультах) (Abraini, David et al. 2005; Weber, Toma et al. 2005; Derwall, Coburn et al. 2009), поскольку одновремено является еще и антагонистом кальция (Petzelt, Blom et al. 2003).

В криобиологии перспективы использования инертных газов для криоконсервации органов и тканей под повышенным давлением являются весьма заманчивыми, но до сих пор не реализованными. (Prehoda 1969; Rodin, Isangalin et al. 1984; Shcherbakov, Tel'pukhov et al. 2004; Sheleg, Hixon et al. 2008). На этом фоне, нужно учесть, что кристаллогидраты ксенона отличаются от клатратов прочих инертных газов тем, что имеют самую высокую (не считая радона – но тот еще более редок, а вдобавок и радиоактивен) температуру образования и сохранения стабильности – приблизительно -1,6°С при атмосферном давлении.

Главными потенциальными преимуществами использования ксенона в качестве газового криопротектора является его абсолютная нетоксичность. Более того, мы предполагаем, что ксенон обладает способностью ослаблять негативные воздействия низких температур на биологические образцы. Для его применения нет нужды менять состав криоконсервационной среды. В то время как даже самый малотоксичный криопротектор, глицерин, потенциально опасен своими гиперосмотическими эффектами (Greene, Athreya et al. 1970; Rowe and Lenny 1980; Kopeika, Kopeika et al. 2003).

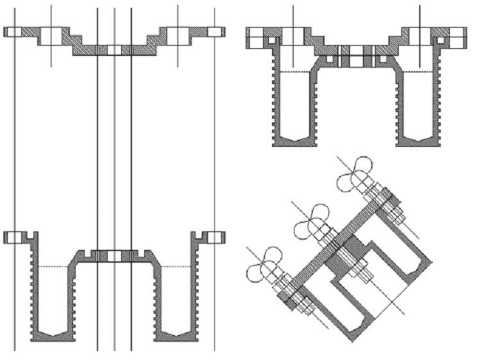


Рис. 1. Чертеж криобарокамеры

**Материалы и методы.** Для использования газовых криопротекторов под повышенным давлением из специальной бронзы, использующейся для изготовления криогенного оборудования, были изготовлены миниатюрные барокамеры под 2 мл криопробирки (рис. 1,2). В одном из слотов криопробирок предусмотрена возможность установки температурного датчика, с тем, чтобы получилось 10 рабочих криопробирок и 1 температурный контроль. Барокамеры без вреда выдерживают охлаждение до температуры жидкого азота, снабжены сальниками из хладостойкой резины и силикона, термоизоляционными контейнерами-”чехлами” из пенопласта.

Рис. 2. Криобарокамеры с чехлами

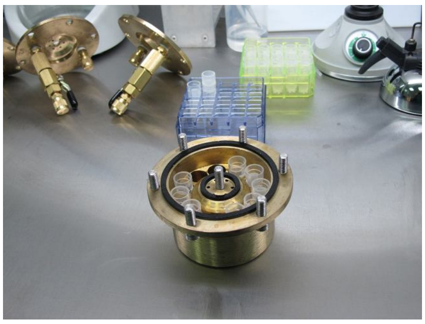


Рис. 3. Размещение криопробирок в барокамеры

Из обыкновенных пекарских дрожжей (Saccharomyces Cerevisidae) была выделена стерильная культура, на которой и проводились все последующие эксперименты. Дрожжи сами по себе относительно неплохо переносят криогенные температуры, а в качестве криопротекторов для них могут быть использованы самые различные вещества (Breierova and Kockova-Kratochvilova 1992; Lewis, Learmonth et al. 1994), вплоть до этанола и метанола. Поэтому была выбрана максимально простая схема охлаждения/

согревания, позволяющая максимально отчетливо проявиться потенциальному эффекту криопротектора. Таким образом, разработанный нами протокол криоконсервации S. Cerevisidae учитывал большую теплоемкость криобарокамер и нестандартность криопротектора.

Рис. 4. Продувка и компрессия барокамеры ксеноном.

Рис. 5. Барокамеры в криотермостате при - 20ºС.

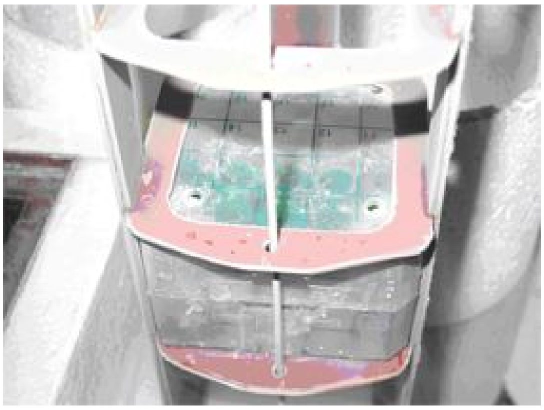


Рис. 6. Помещение криопробирок в криохранилище

Двухмиллилитровые криопробирки с суспензией культуры дрожжей (5-7x$10^6$ кл/мл) либо в чистом солодово-пептонном бульоне, либо в бульоне с добавлением 5% глицерина или диметилсульфоксида (ДМСО), при комнатной температуре в асептических условиях помещались в криобарокамеры (рис. 3). Те герметизировались, часть из них продувалась чистым ксеноном, после чего им же давление доводилось в них до запланированного (рис. 4). Остальные, в качестве контроля, оставались с обычным воздухом или чистым азотом либо при атмосферном давлении, либо при повышенном до тех же цифр, что и в опытах с ксеноном. Затем барокамеры помещались в криотермостат (спиртовую баню) при -20$^o$C и выдерживались 2 часа (рис.5), после чего либо сначала охлаждались со скоростью ~1,5$^o$C в минуту до -80$^o$C, либо сразу помещались в жидкий азот.

В дальнейшем барокамеры помещались в пенопластовые термоконтейнеры, крышки с них быстро снимались, на криопробирки в стерильных условиях навинчивались захоложенные в жидком азоте крышки, и пробирки переносились в криохранилище (рис. 6).

Для размораживания криопробирки доставались по одной и быстро нагревались в водяной бане при +37$^o$C до растворения льда/клатрата.

Выживаемость клеток определялась методом дифференциального окрашивания трипановым синим.

**Результаты.** Как показали эксперименты, ни резкая декомпрессия с активным пенообразованием, происходящая при таянии клатрата, ни сами методы охлаждения на выживаемость дрожжей практически не влияли – при условии сохранности содержимого в процессе.

Результаты оказались весьма обнадеживающими: для дрожжей ксенон обладает криопротекторным эффектом при всех опробованных парциальных давлениях (от 3 до 7 ат) – по крайней мере, не меньшим, чем глицерин или диметилсульфоксид. Впрочем, даже без каких-либо криопротекторов выживаемость дрожжей тоже весьма неплоха – в среднем порядка 35±6%, в то время как и 5%, и 10% глицерин дают выживаемость порядка 50±25%. Что интересно, повышение давления как воздуха, так и чистого азота до 6 ат на процент выживаемости никак не влияло. Выживаемость дрожжей при 6 ат ксенона составила 68,5±6%. Совместное применение ксенона с добавлением в культуральную среду 5% глицерина или диметилсульфоксида с ксеноном синергетического эффекта, к сожалению, не дало. Выживаемость оказалась в среднем 71±15%, что укладывается в пределах погрешности, оказавшейся в наших экспериментах довольно большой из-за относительно малой выборки.

## Литература


1. Abraini, J. H., H. N. David, et al. (2005). “Potentially neuroprotective and therapeutic properties of nitrous oxide and xenon.” Annals of the New York Academy of Sciences 1053: 289-300.
2. Boswell, R. (2009). “Is Gas Hydrate Energy Within Reach?” Science 325(5943): 957-958.
3. Breierova, E. and A. Kockova-Kratochvilova (1992). “Cryoprotective effects of yeast extracellular polysaccharides and glycoproteins.” Cryobiology 29(3): 385-390.
4. Claussen, W. F. (1951). “Suggested Structures of Water in Inert Gas Hydrates.” The Journal of Chemical Physics 19(2): 259-260.
5. Derwall, M., M. Coburn, et al. (2009). “Xenon: recent developments and future perspectives.” Minerva anestesiologica 75(1-2): 37-45.
6. Greene, A. E., B. H. Athreya, et al. (1970). “The effect of prolonged storage of cell cultures in dimethyl sulfoxide and glycerol prior to freezing.” Cryobiology 6(6): 552-555.
7. Hecker, K., J. H. Baumert, et al. (2004). “Xenon, a modern anaesthesia gas.” Minerva anestesiologica 70(5): 255-260.
8. Kaiho, K., T. Arinobu, et al. (1996). “Latest Paleocene benthic foraminiferal extinction and environmental changes at Tawanui, New Zealand.” Paleoceanography 11(4): 447-465.
9. Kopeika, J., E. Kopeika, et al. (2003). “Studies on the toxicity of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol to loach (Misgurnus fossilis) sperm and the effect on subsequent embryo development.” Cryo Letters 24(6): 365-374.
10. Kornetov, N. A., M. N. Shpisman, et al. (2002). Application of medicinal xenon narcosis in complex therapy of abstinence syndrome in opiate addiction (in Russian).
11. Lewis, J. G., R. P. Learmonth, et al. (1994). “Cryoprotection of yeast by alcohols during rapid freezing.” Cryobiology 31(2): 193-198.
12. Pauling, L. (1961). “A molecular theory of general anesthesia.” Science 134(3471): 15-21.
13. Petzelt, C., P. Blom, et al. (2003). “Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon.” Life sciences 72(17): 1909-1918.
14. Prehoda, R. W. (1969). Suspended Animation: The Research Possibility that May Allow Man to Conquer the Limiting Chains of Time, Chilton Book Company.
15. Rodin, V. V., F. S. Isangalin, et al. (1984). “Structure of protein solutions in a presence of xenon clathrate.” Cryobiology & Cryo-Medicine 14: 3-7.

16. Rowe, A. W. and L. L. Lenny (1980). "Cryopreservation of granulocytes for transfusion: studies on human granulocyte isolation, the effect of glycerol on lysosomes, kinetics of glycerol uptake and cryopreservation with dimethyl sulfoxide and glycerol." Cryobiology 17(3): 198-212.
17. Shcherbakov, P. V., V. I. Tel'pukhov, et al. (2004). Method for Organs and Tissues Cryoconservation In Situ.
18. Sheleg, S., H. Hixon, et al. (2008). "Cardiac Mitochondria l Membrane Stability after Deep Hypothermia using a Xenon Clathrate Cryostasis Protocol - an Electron Microscopy Study." International Journal of Clinical and Experimental Pathology 1(5): 440-447.
19. Sloan, E. D. (2003). "Fundamental principles and applications of natural gas hydrates." Nature 426(6964): 353-363.
20. Stackelberg, M. v. and H. R. Mьller (1951). "On the Structure of Gas Hydrates." The Journal of Chemical Physics 19(10): 1319-1320.
21. Weber, N. C., O. Toma, et al. (2005). "The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK." British journal of pharmacology 144(1): 123-132.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КСЕНОНА

**Пульвер А. Ю., Целиковский А. В., Пульвер Н. А., Артюхов И. В., Перегудов А. Г.**

*НТЦ криобиологии и анабиоза, Москва, Россия*

*Кафедра инфекционных болезней ВГМА им. Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия*

E-mail: scidep@ntckba.ru

В отличие от дрожжей, которые замораживались по примитивному протоколу (см. в данном сборнике "Криоконсервация Saccharomyces…"), для культур клеток млекопитающих мы планировали использовать в основном различные варианты градиентного охлаждения (Thirumala, Goebel, et al. 2009) в наших собственных модификациях. Оно отлично показало себя в нашей лаборатории, давая клеточную выживаемость не менее 85%, а чаще даже более 90% клеток. Для определения криопротекторных свойств ксенона клеточные культуры: CHO-K1 – с предполагаемой хорошей выживаемостью после криоконсервации, и NIH-3T3 (рис. 1) – с посредственной. Единственным осложнением оказалась необычно высокая выживаемость NIH-3T3 после замораживания до криогенных температур, превосходящая паспортную – более 90% клеток, практически ничем не отличающаяся от таковой у CHO-K1.

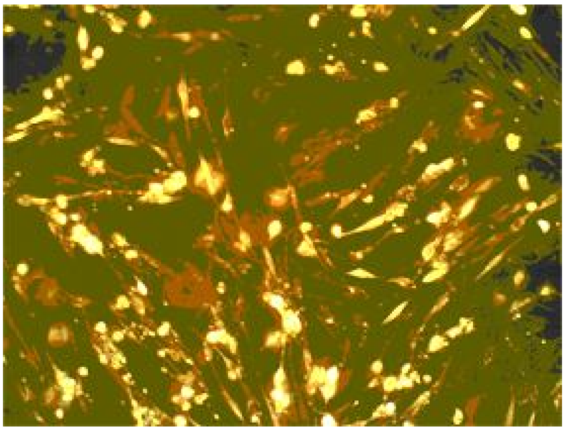


Рис. 1. Монослой NIH-3T3 (х150, фазовый контраст).

Схема охлаждения была взята следующая: криопробирки с клеточной культурой избранного состава либо при комнатной температуре (в отсутствие диметилсульфоксида (DMSO)), либо на ледяной бане (в случае использования DMSO) в стерильных условиях помещались в барокамеру, та герметизировалась и минуту продувалась либо азотом, либо ксеноном, либо воздухом с добавлением 5% $CO_2$, после чего давление доводилось до запланированного путем добавления ксенона.

Затем барокамера помещалась либо сразу в жидкий азот (“шоковая заморозка”), либо в криотермостат (спиртовую баню) при 4pC (рис. 2) и постепенно охлаждалась (со скоростью 1-1,5°С в минуту) до -80°С. После чего криобарокамера захолаживалась в жидком азоте, помещалась в пенопластовый термоконтейнер, где крышка с нее быстро снималась, на криопробирки навинчивались предварительно захоложенные в жидком азоте крышки, после чего пробирки переносились в криобокс и вслед за тем в криохранилище. Примитивные “дрожжевые” протоколы и “шоковую заморозку” мы использовали только в небольшом количестве случаев для ”контрольных групп”, в которых не предполагалось выживания клеток.

**Результаты.** *Скоростное размораживание на водяной бане при 4°С.* Давление ксенона и контроля (азот) пробовались различные – от 2,5 ат и вплоть до 12. Для размораживания вначале мы попробовали согревать криопробирки на водяной бане при 37°С до растворения льда/клатрата. Как оказалось, в экспериментальной группе в препаратах, замороженных с ксеноном без добавления криопротекторов (любого протокола градиентной заморозки и состава культуральной среды), при давлении больше 3 ат во время разморозки имело место сильное пенообразование, а при микроскопии клетки вообще не определялись. Даже просто целых, а тем более, жизнеспособных, клеток не было.

Рис. 2. Охлаждение в криотермостате.

В препаратах, замороженных при 2,5-3 ат, после разморозки отдельные части клеток микроскопически определялись, но живых и даже просто целых на вид все равно не было.

В то же время в препаратах, замороженных с ксеноном в присутствии традиционных криопротекторов (ДМСО, глицерин), несмотря на сильнейшее пенообразование (зачастую выталкивающее более 90% образца из криопробирки) имела место сравнимая с безксеноновым (азот при тех же давлениях и прочих криопротекторах) контролем (60,2±7%) выживаемость клеток при всех опробованных давлениях – в среднем 56,9±27,7%. Из прочих особенностей при микроскопии была замечена склонность к образованию кластеров из нескольких клеток. Такая высокая выживаемость объясняется, судя по всему, способностью криопротекторов подавлять клатратообразование (Cruz-Torres, Romero-Martinez, et al. 2008; Booker, Koh, et al. 2011).

*Компьютерное моделирование взаимодействия ксенона с водой*

Вышеописанные результаты заставили нас предположить, что разрушение клеток происходит на этапе разморозки, и обратиться за помощью к коллегам для проведения дополнительных исследований по моделированию свойств газогидратов ксенона (рис. 3).

Согласно расчетам (V. Artyukhov, Pulver, et. al. 2014) оказалось, что ксенон начинает образовывать клатраты при концентрации приблизительно 1 молекула на 20 молекул воды, а стабильный клатрат содержит 1 молекулу ксенона приблизительно на 7 молекул воды. В результате при начале внутриклеточного клатратообразования количество растворенного в цитоплазме ксенона начинает стремительно падать, и по градиенту концентрации все новые и новые молекулы ксенона поступают в клетку из внеклеточного пространства, клетке не будет связана в виде кристаллогидрата вся вода. При нагревании, как только клатрат перестает быть стабильным (при атмосферном давлении это –1.6°), из него выделяется ксенон, и, по превышении уровня своей растворимости в цитоплазме – мгновенно переходит в газовую фазу и разрушает клетку (Derwall, Coburn,

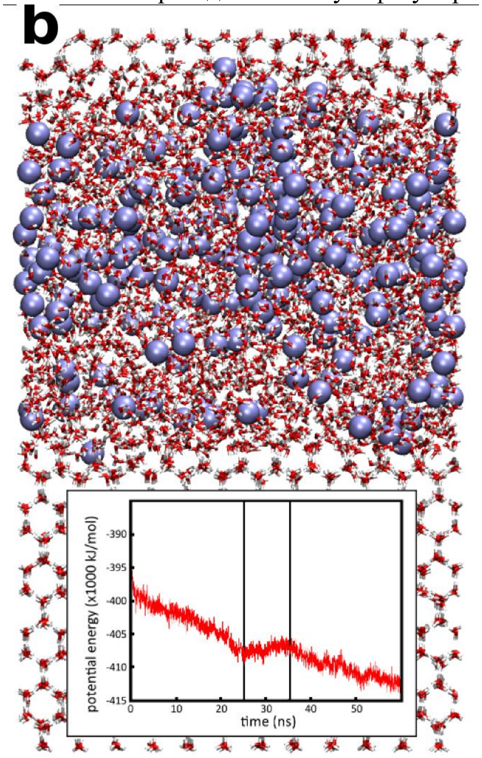



Рис. 3. (V. Artyukhov, Pulver, et. al. 2014) Замерзание раствора ксенона. Финальная структура двухфазной системы: 4% mol.Xe/mol.H2O, 268 К, 1 ат.

Впоследствии это подтвердилось в экспериментах с мотылем, который также практически не реагировал на повышенное давление воздуха или азота и даже на быструю декомпрессию. А вот при охлаждении в присутствии ксенона при последующем нагреве появлялось большое количество крупных пузырей, сливающихся между собой в “цистерны” внутри хитиновых сегментов тел личинок. Сами же они теряли гемолимфу, утекавшую в окружающий раствор (рис. 4), и не проявляли двигательную активность, вплоть до отсутствия сердечных сокращений.

На основании вышеописанного мы сделали следующие выводы: чтобы клетки не разрывало, необходимо, во-первых, разрушать клатрат при таком давлении, когда выделяющийся газ может целиком раствориться в жидкости. Во-вторых, после размораживания проводить постепенную декомпрессию, причем во время нее обеспечить как можно меньшую концентрацию ксенона во внеклеточном пространстве, для еще большего облегчения выхода ксенона из клеток без перехода в газовую фазу. В связи с этим был изготовлен дополнительный съемный балластный объем (примерно 150 мл), монтируемый на криобарокамеру во время декомпрессии.

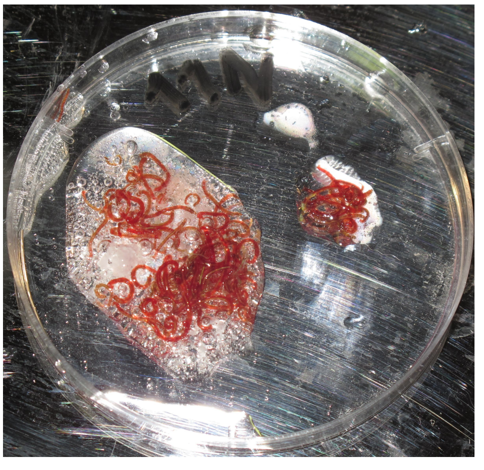


Рис. 4. Мотыль, таяние клатрата.

*Размораживание при 8-10 ат гелия (Не) х последующей 30-50 минутной декомпрессией*

Для декомпрессионной разморозки был разработан следующий протокол. Нижняя часть криобарокамеры (без крышки) захолаживается в жидком азоте в течение 5-6 минут, после чего вставляется в пенопластовую термоизоляцию и переносится в ламинарный бокс. Криопробирки достаются из емкости с жидким азотом и после откручивания крышек размещаются в ячейках криобарокамеры. Последняя закрывается крышкой, герметизируется и убирается из ламинарного бокса, после чего заполняется гелием до 8-10 ат, ставится в водяную баню при 37°С на 3-4 мин, после чего перемещается в емкость с водой комнатной температуры и выдерживается там либо 20-30, либо 50 минут, после чего начинается 30- или 50-минутная ручная декомпрессия (подбираемая по скорости выделения пузырьков газа в минуту). При декомпрессии пространство над криопробирками продувалось газом с нулевым содержанием ксенона из балластного объема, а мелкие подвижные молекулы гелия дополнительно облегчали декомпрессию.

В результате, после такой декомпрессии у клеток, замороженных с ксеноном в присутствии традиционных криопротекторов (ДМСО, глицерин) появилась сравнимая с безксеноновым (азот при тех же давлениях) контролем выживаемость клеток при всех опробованных давлениях – в среднем 60±25% (рис. 5). При этом разницы в выживаемости при 8 и 10 ат не обнаружено в пределах статистической погрешности, равно как и при различном времени декомпрессии. Единственное отличие – при более высоком давлении, либо при 30-минутной декомпрессии в криопробирках замечалось бульшее пенообразование, чем при 8 ат или 50 минутах.

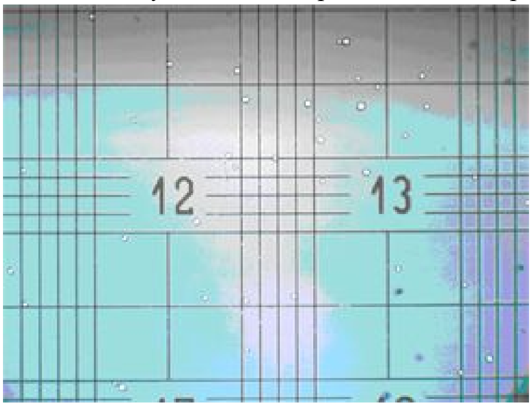



Рис. 5. 85% выживаемость (7 ат Xe + 10% $Me_2SO$, градиентное охлаждение).

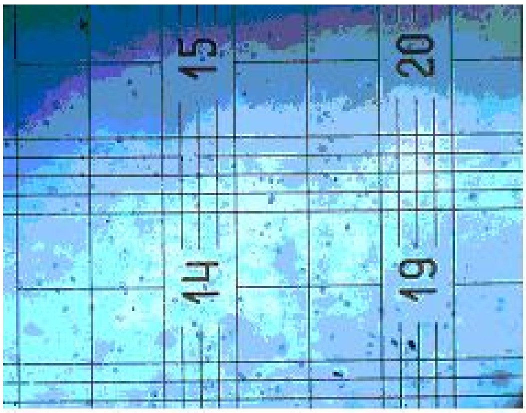



Рис. 6. Отсутствие живых клеток (7 ат Xe, градиентное охлаждение).

Кстати, примечателен тот факт, что, как и в случае дрожжей, само по себе повышенное давление на выживаемость культур клеток млекопитающих также не влияет.

К сожалению, у клеток, замороженных по градиентным протоколам только с ксеноном, выживаемость все равно оставалась нулевой. Хотя сами клетки получались целыми, оформленными – но мертвыми (рис. 6). Контрольные же эксперименты, к нашему удивлению, дали совершенно другие результаты. Препараты, замороженные по “дрожжевому протоколу”

(2 ч. при -20°C, погружение барокамеры в жидкий азот)» с 7 ат ксенона (рис. 7), показали клеточную выживаемость в 2,8±2,3% (от 0,5% до 8,1%). Препараты, замороженные по тому же протоколу с 6 ат R134a – 2,4±0,9% (от 1,6% до 4,4%). А совсем “не подававшие надежд” препараты с разными вариантами ”шоковой заморозки” (максимально быстрое охлаждение от 0°C до -196°C путем погружения барокамеры в жидкий азот) с 7 ат ксенона дали выживаемость соответственно в 10,5±4,4% и 22,5±13,4%.

Рис. 7. 7% выживаемость (7 ат Xe).

Все вышеперечисленное говорит о том, что ксенон, несмотря на опасность разрушения клеток при таянии клатрата, все же обладает криопротекторными свойствами, и применение газовых криопротекторов является потенциально весьма перспективным. Однако требует разработки принципиально новых протоколов заморозки и программной декомпрессии.

**Литература**


1.Artyukhov, V., A. Pulver, et. al. (2014). “Impact of xenon on the freezing of water: molecular dynamics.” The Journal of Chemical Physics (in press).

2.Booker, R. D., C. A. Koh, et al. (2011). “Xenon hydrate dissociation measurements with model protein systems.” The Journal of Physical Chemistry B 115(34): 10270-10276.

3.Cruz-Torres, A., A. Romero-Martinez, et al. (2008). “Computational study on the antifreeze glycoproteins as inhibitors of clathrate-hydrate formation.” Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry. 9(11): 1630-5.

4.Derwall, M., M. Coburn, et al. (2009). “Xenon: recent developments and future perspectives.” Minerva anestesiologica 75(1-2): 37-45.

5.Mendes, F. F. and M. E. Gomes (2003). “Xenon: pharmacology and clinical use.” Revista Brasileira de Anestesiologia 53(4): 535-542.

6.Thirumala, S., W. S. Goebel, et al. (2009). “Clinical grade adult stem cell banking.” Organogenesis 5(3): 143-154.

## ВМІСТ БІОЛОЛГЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК В ТКАНИНІ І КРІОЕКСТРАКТІ ПЛАЦЕНТИ

**Строна В.І., Юрченко Т.М.**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН, м.Харків, Україна*

E-мail: cryo@online.kharkov.ua

Збільшення числа захворювань, що супроводжуються імунною чи ендокринною недостатністю, визначає високу потребу у відповідній тканинній терапії. У плані джерела лікування різних патологій організму безсумнівний інтерес має тканина плаценти, що використовувалася починаючи з 50-х років як біогенний стимулятор, що впливає на метаболічні процеси. Плацента є провізорним ендокринним органом, синцитіотрофобласт якого активно синтезує та секретує стероїдні гормони (естрогени, андростендіол, тестостерон, прогестерон), а цитотрофобласт - хоріонічний гонадотропін. Плацента також секретує репродуктивні імуномодулятори, адренокортикотропний і соматотропний гормони, окситоцин, а також є природним депо вітамінів, ферментів, різних біологічно активних речовин (цитокіни, фактори росту і т.і.). Фармакопейні препарати з тканини плаценти - це водяні витяжки, що містять речовини з плаценти, що дифундують у розчин. Ці препарати піддаються тепловій обробці, що призводить до інактивації біологічно активних білкових речовин. Виходячи з цього виникла необхідність розробки методу кріоконсервації тканини плаценти для її подальшого використання в різних клінічних ситуаціях. Проведені протягом останнього років експериментальні дослідження з вивчення кріочутливості тканини плаценти і можливості отримання біопрепаратів дозволили одержати біоматеріал, що володіє вираженим клінічним ефектом. Препарати кріоконсервованої плаценти з успіхом застосовуються при фетоплацентарній недостатності, гіпоксії, гіпотрофії плода, невиношуванні, імунологічному конфлікті вагітності, у вигляді біологічних пов’язок при лікуванні ран, що гранулюють, пролежнів, у лікуванні опіків і в пластичній хірургії, при цукровому діабеті і т.д. (ГольцевА.Н., ЮрченкоТ.Н.,2013). Було відзначено, що пропонована біотехнологія дозволяє досягти не тільки неспецифічної біостимулюючої дії, але і специфічного імуно-ендокринного впливу препаратів на організм хворого. Плацента може служити джерелом для отримання цілого ряду препаратів як загального, так і спрямованого етіопатогенетичного впливу. Спектр біопрепаратів, що отримуються із плаценти, розширюється.

Проводиться вивчення дії імплантатів кріоконсервованої плаценти, гомогената посліду, кріоконсервованих амніотичних і хоріальних оболонок для біологічних пов'язок, в оперативній офтальмології, різних екстрактів плаценти. Клінічна ефективність біопрепаратів, отриманих із плаценти, багато в чому обумовлена широким спектром гормонів і біологічно активних речовин, що містяться в цій тканині. Виходячи з цього, метою дослідження було вивчення вмісту деяких гормонів у біопрепаратах, отриманих на основі плаценти. Вміст гормонів визначали в екстракті, отриманому з плаценти після кесаревого перетину методом імуноферментного аналізу. Кріоекстракт плаценти отримували за методом, розробленим в ІПКиК НАНУ. Паралельно визначали вміст тих же гормонів в офіційному препараті екстракту плаценти. Дослідження проведені на плацентах, отриманих від 8 донорів. Статистична обробка проведена за методом Стьюдента. Вміст гормонів і біологічно активних речовин в абсолютних цифрах приведений в таблиці .

Як еталон для порівняння рівня гормонів у препаратах, отриманих із плаценти, був узятий фармакопейний препарат "екстракт плаценти для ін'єкцій". Концентрацію гормонів у цьому препараті також визначали за допомогою методу ІФА. Виявилося, що тільки прогестерон міститься в концентрації 110 нг/мл (в екстракті плаценти порядку 326 нг/мл, АФП і ХГЛ – у незначній кількості. Естрадіол, пролактин, альфа-мікроглобулін фертильності і лактоферин не визначаються, ймовірно із-за незначного вмісту. Очевидно, це пов'язано з тим, що макромолекули цих гормонів підпадають під конформаційні зміни в процесі стерилізації аптечних препаратів у результаті чого їхня функціональна активність втрачається. Біопрепарати плаценти, виготовлені за технологією з використанням низьких температур, функціонально більш повноцінні,тому що зберігається структура біологічно активних білкових і стероїдних гормонів.

Як видно, в екстракті, отриманому з тканини плаценти, вміст усіх вивчених гормонів дуже високий. Для порівняння можна привести дані про вміст деяких гормонів у сироватці крові: Не викликає сумніву, що вміст гормонів в екстракті плаценти в сотні разів перевищує рівень їхнього вмісту в крові. Абсолютна більшість патологічних процесів протікає в організмі ссавців за участю імунної системи (Игнатьева Г.А.,1997). При цьому характер і ступінь розвитку цих процесів багато в чому визначається

Таблиці.

Гормони і біологічно активні сполуки в тканині і кріоекстракті плаценти

| Назва | Характеристика гормонів і біологічно активних сполук | Сироватка крові | Тканина плаценти |
|---|---|---|---|
| Альфа-фетопротеін | активатор (або інгібітор) росту ембріональних, трансформованих, активованих имунокомпетентних клітин | 2,5 – 13,1 мМО/мл | 4290 ± 75 мМО/мл |
| Хоріоничнний гонадотропін | активатор имунної системи, стимулює продукцію стероідних гормонів (тестостерона і естрадіола) | 0 – 5 мМО/мл | 26,8 ± 8 мМО/мл |
| Эстрадіол | репродуктивна функція, кардіопротекторна дія | 30 – 120 пг/мл | 2770 ± 176 пг/мл |
| Назва | Характеристика гормонів і біологічно активиих сполук | Сироватка крові | Тканина плаценти |
| Прогестерон | репродуктивна функція, кардіопротекторна дія | 0,2- 1,4 нг/мл | 718 ± 352 нг/мл |
| Пролактин | вплив на развиток вторинних статевих ознак, еритропоетична дія, регуляція жирового обміну | 2,7 – 16,9 нг/мл | 1800 ± 195 нг/мл |
| АМГФ | підготовка до вагітності, процес зачаття, нормальний развиток фетоплацентарної одиниці | 16 – 70 нг/мл | 1470 ± 173 нг/мл |
| Лактоферин | стимуляція лактації | 340 - 540 нг/мл | 1270 ± 223 нг/мл |
| СТГ | гормон росту, анаболічна дія | 2 - 10 нг/мл | 5,64 нг/мл |
| Фолікулостимулючий гормон | гормон гіпофіза, індукує визрівання фолікулів у яєчниках і сперматогенез у самців | 9 - 25 МО/л | 7,1 ± 2,3 мМО/л |
| Лютеінизующий гормон | гормон гіпофіза, секреція естрогенів, прогестерону, тестостерону | 13 - 21 МО/л | 7,8 ± 1,9 МО/л |
| Тестостерон | диференціація і функціювання репродуктивної системи, анаболічна дія | менее 5 нМоль/мл | 26 ± 10 нМоль/л |
| Тиреотропний гормон | стимуляція функції щитоподібної залози, імуномодулююча дія | 0,2 – 3,5 мМО/л | 291 ± 13 мМО/л |
| Т4 | стимуляція обміну речовин, ріст і диференціація тканин, процеси розмноження, гемопоэз | 10 – 23 пМоль/л | 5,6 ± 0,99 пМоль/л |
| Т3 | стимуляція обміну речовин, ріст і диференціація тканин, процеси размноження, гемопоэз | 2,5 – 5,8 пМоль/л | 2,1 ± 0,6 пМоль/л |
| Кортизол | обмін білків, вуглеводів, жирів і нуклеїнових кислот | 150 – 660 нМоль/л | 1392 ± 515 нМоль/мл |
| G-CSF | проліферація клітин кісткового мозку | | 9,87 нг/мл |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ФНО-α | ингібітор проліферації ракових клітин | 0 - 6 пг/мл | 84,5 пг/мл |
| IL-1β | регуляція диференціації поліпотентних стовбурових клітин, імунно-ендокринної системи і т.і. | 0 - 40 пг/мл | 201,7 пг/мл |
| IL-4 | регуляція диференціації поліпотентних стовбурових клітин, імунно-ендокринної системи і т.і. | 0 - 13 мг/мл | 21,7 пг/мл |
| IL-6 | регуляція диференціації поліпотентних стовбурових клітин, імунно-ендокринної системи і т.і. | 0 - 10 пг/мл | 114,9 п г/мл |
| Загальний білок | | | 76,5 ± 14 мг/1 г ваги |
| Білки М.м. 20-100 кДа | | | 70 – 80 % |
| Білки М.м. нижче 20 кДа | | | 20 – 30 % |

порушенням взаєморегулюючої активності різних субпопуляцій імуннокомпетентних клітин і відхилення від фізіологічного балансу рівня цитокінів, які вони продукують (Возианов А.Ф. и др.1998). Цитокіни, як і інші поліпептидні фактори росту, мають різну молекулярну масу, структуру, але усі вони роблять прямий чи опосередкований вплив на швидкість проліферації клітин. Найголовнішими властивостями цитокінів є дублювання якої-небудь активності багатьма з них, а також плейотропізм (Возианов А.Ф. и др.1998). Найбільш виражену активність стосовно імунної системи організму має тканина плаценти і препарати, отримані з неї (зокрема екстракт). Широкий спектр гормонів, білків "зони вагітності" з гормональною, ферментативною і, поки ще не встановленою, функцією, що присутні в тканині плаценти, обумовлює її імунномодулюючу активність і вплив на метаболичні процеси в цілому. У плаценті присутні стимулятори росту по ліпотентних і комітованих кровотворних клітин: це фактори, що стимулюють утворення колоній, і цитокіни (інтерлейкіни) - ІЛ 1, ІЛ-6, ІЛ-3, ІЛ-11, ІЛ-12, ІЛ-15 і т.д. Присутність саме ІЛ-1 і ІЛ-6 дозволяє вважати прояв субстанціями плаценти гематотропної активності в організмі (Грищенко В.И.,Гольцев А.Н.,2001). Таким чином, поліфункціональність дії плацентарних цитокінів може визначатися їх здатністю виявляти імунно- і гемопоезкорегуючу активність. Фракційний склад білків препаратів, отриманих з плаценти людини, був вивчений за допомогою методу диск-електрофореза в ПААГі. Поділ білків за молекулярною масою проводили в у градієнтному гелі 8-25 % акриламіду при загальній концентрації білків 1,9-2,4 мг/моль, білки забарвлювалися барвником Кумасі. Після електрофоретичного фракціонування білків їх умовно можна розділити на 3 групи: 1 - високомолекулярні, що мають молекулярну масу (Мм) вище

100 кДа. Як правило такі білки є складовою частиною цитоскелету клітин, білковою основою мікрофіламентів і мікротрубочок клітини.

1 група - білки, що мають Мм 20-100 кДа. Функціонально представлені, в основному, білками-ферментами, що беруть участь у життєдіяльності клітин і тканин.

2 група - низькомолекулярні білки і пептиди, що легше 20 кДа. Здебільшого їх можна віднести до регуляторних, що секретуються, або біологічно активних компонентів тканин.

При вивченні білкового складу екстракту плаценти встановлено, що загальний вміст білка в тканині плаценти складає 76,5 ± 14 мг на 1 г ваги тканини. При фракціонуванні білків звертає на себе увага практично повна відсутність високомолекулярних структурних білків і високий вміст фракцій середньо- (1 група) і низькомолекулярних білків (2 група) у кількості 70 - 80 % і 20 - 30 % відповідно. Один з основних механізмів дії фетоплацентарних тканин полягає в тім, що вони здатні продукувати найширший спектр збалансованих за концентрацією біологічно активні субстанції, що реалізують свою дію в конкретних умовах і корегують функціональний статус систем забезпечення гомеостазу (Грищенко В.И.,Гольцев А.Н.,2001). Таким чином, вивчення кількісного і якісного складу білків екстракту плаценти свідчить про високий вміст у них низько- і середньомолекулярних білкових фракцій, що мають, як передбачається, високу біологічну активність.

**Література**

1. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Под ред. А.Н.Гольцева, Т.Н.Юрченко. Харьков. 2013. 317 с.

2. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов фетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. 2001. № 1. С. 54-85.

3. Игнатьева Г.А. Иммунная система и патология // Журнал патофизиологии и экспериментальной медицины. 1997. № 4. С. 26-37.

4. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Бологические и противоопухолевые свойства. Киев: Наук. думка, 1998. 316 с.

# СОВРЕМЕННЫЕ ПОХОДЫ К КОНСЕРВИРОВАНИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ

**Худяков А.Н., Зайцева О.О., Полежаева Т.В., Соломина О.Н., *Утемов С.В.**

*ФГБУН Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия,*

*ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России, Киров

E-mail: ddic@yandex.ru

В настоящее время криоконсервирование является широко известным методом, способным обеспечить длительную сохранность лейкоцитов крови человека, применяемых в качестве трансфузионной среды при ряде заболеваний: лейкопения различного генеза с угрозой развития или развивающимися инфекционными осложнениями, гипо- и апластические состояния кроветворения, медикаментозные агранулоцитозы, тяжелый сепсис, онкологические и гематологические заболевания с резким угнетением лейкопоэза в результате применения химио- и лучевой терапии и др. (Мельникова В.Н., 1995; Рыжков С.В. и соавт., 1995; Neppert J., 1996, Сведенцов, 1999).

В качестве криозащитных сред для сохранения лейкоцитов в условиях отрицательных температур используют в основном комбинированные криоконсерванты, включающие в свой состав протекторы экзо-, эндоцеллюлярного или смешанного действия с различными «реставрирующими» добавками. Известно, что наиболее значимым компонентом лейкоконцентрата при трансфузии является популяция гранулоцитов, обеспечивающих неспецифическую защиту организма. Сохранение морфологических и функциональных свойств данных клеток является одним из основных критериев эффективности использования того или иного криоконсерванта.

В настоящее время нашли широкое применение эндоцеллюлярные криопротекторы – глицерин и диметилсульфоксид, защитное действие которых основано на связывании воды, образовании мелких кристаллов льда при замораживании и снижении концентрации солей внутри клетки, а также образовании связи со структурными компонентами мембраны клеток, что ведет к снижению ее повреждения при криоконсервировании. Однако используемые криопротекторы токсичны в высоких концентрациях и требуют удаления перед трансфузией лейкоцитов, что дополнительно травмирует клетки, вызывая их гибель.

Среди экзоцеллюлярных криопротекторов наиболее известен гидроксиэтилкрахмал, действие которого направлено на дегидратацию клеток и стабилизацию фракции внеклеточной воды. Однако это вещество в настоящее время используют в основном в качестве трансфузионной среды в связи с низкими криозащитными свойствами в отношении лейкоцитов.

Малоизученной является возможность применения клатратных соединений инертных газов: аргона, криптона, ксенона и т.д. в качестве газовых криопротекторов.

До настоящего времени остается без внимания и применение в качестве криопротекторов или «реставрирующих» добавок природных пектиновых полисахаридов, хотя известно, что углеводы (глюкоза, сахароза) как компоненты криозащитных сред широко используются для консервирования клеток.

Данная работа предлагает использование трех современных, эффективных и различных по составу и свойствам криоконсервантов для замораживания и хранения лейкоцитов крови человека при -80°С с применением электрорефрижераторной технологии.

В работе были использованы лейкоцитные концентраты доноров-добровольцев, полученные методом цитафереза в объеме 18±4 мл. Перед замораживанием лейкоцитный концентрат либо смешивали 1:1 с одним из двух консервантов, либо насыщали инертным газом. В состав первого комбинированного хладоограждающего раствора входили: криопротектор смешанного действия ГМБТОЭМ и эндоцеллюлярный криопротектор ДМСО (патент РФ №2290808). Второго – эндоцеллюлярный протектор глицерин и пектиновый полисахарид танацетан, выделенный из пижмы обыкновенной. Оба раствора содержали протекторы в нетоксичных для клеток концентрациях. После 20 минутной экспозиции при комнатной температуре смесь погружали в спиртовую ванную электрического морозильника «Криостат» (Украина) на -28°С на 15 мин, затем переносили для дальнейшего замораживания и хранения в течение 1 суток в воздушную камеру электроморозильника на -80°С MDF-3086S «Sanyo» (Япония).

В качестве инертного газа (третий «консервант») для консервирования лейкоцитов использовали ксенон, т.к. он обладает низкой токсичностью, хорошей растворимостью и проницаемостью через клеточные мембраны, а также способен образовывать клатратные соединения при 0°С под давлением в 1,5 атм. В пластикатный контейнер «Компопласт» с лейкоцитным концентратом, помещенным в металлический криобароконтейнер (положительное решение о выдаче патента РФ), нагнетали ксенон под давлением 0,6 атм, экспонировали при комнатной температуре 20 мин. Затем давление стравливали до атмосферного, «Компопласт» с биообъектом извлекали из криобароконтейнера и замораживали в течение 15 мин в хладагенте (96% этиловый спирт) при -28°С в электрическом морозильнике «Derby» (Дания), затем переносили для дальнейшего замораживания и хранения в воздушную среду электроморозильника на -80°С MDF-3086S «Sanyo» (Япония).

Быстрое размораживание смеси осуществляли в 20-литровой водяной ванне при температуре +38°С в течение 45-50 с до температуры клеточной взвеси +2 ч +4°С.

Оценивали с помощью метода световой микроскопии процент сохранности общего количества лейкоцитов путем подсчета в камере Горяева и количества гранулоцитов по данным лейкоформулы, а также степень устойчивости мембраны клеток к витальному красителю эозину.

При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднее квадратичное отклонение (М±δ). Для выявления статистической значимости различий между группами применяли непараметрический критерий Уилкоксона (Гланц С., 1998) с использованием компьютерной программы для медико-биологической статистики «BIOSTAT».

Установлено, что при использовании в качестве криозащитной среды первого криоконсерванта (n=10; M±σ) количество лейкоцитов сохраняется на уровне 95,9±3,9% (от исходного значения), гранулоцитов 94,5±6,9% и 90,9±7,1% лейкоцитов остаются устойчивыми к витальному красителю эозину.

Применение второго раствора (n=10; M±σ) позволило сохранить 78,3±7,0% лейкоцитов, 83,2±3,4% из которых устойчивы к эозину, а также 55,7±7,5% гранулоцитов.

Ранее было показано, что наличие в смеси с лейкоцитами одного глицерина в 3,5% конечной концентрации не способствует сохранению их функциональных свойств после деконсервирования (Соломина О.Н. и соавт., 2010). Пектиновый полисахарид танацетан, по химической природе состоящий на 64% из галактуроновой кислоты с небольшим содержанием галактозы, арабинозы и рамнозы, усиливает действие глицерина и позволяет сохранить лейкоциты в биологически полноценном состоянии.

При использовании ксенона в качестве криозащитной среды оценка целостности плазматической мембраны лейкоцитов с витальным красителем показала, что после деконсервирования сохраняется 97,6±2,5% лейкоцитов, неповрежденной мембраной обладает 64,5±14,4% клеток от исходного уровня (n=5, M±σ). Морфологическая сохранность гранулоцитов, как наиболее лабильной популяции лейкоцитов, составляет 86,0±11,0%. Высокие показатели обусловлены оптимальным сочетанием медленного замораживания и быстрого отогрева биообъекта (Сведенцов Е.П. и соавт., 2008).

Таким образом, показана возможность применения как искусственно синтезированных, так и природных криофилактиков для повышения устойчивости лейкоцитов при температуре -80°С. Это позволяет расширить имеющиеся представления о методах криоконсервирования клеток с помощью электрорефрижераторных технологий.

**Литература**


1. Neppert J. Therapie mit granulozyten // In: Transfusion medicin. Berlin: Verlag-Springer. 1996. P.339-344.

2. Белоус А. М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев: Наукова думка. 1994. 431 с.

3. Гланц С. Медико–биологическая статистика. М.: Практика. 1998. 459 с.

4. Мельникова В.Н. Получение и клиническое применение при гнойно-септических заболеваниях лейкоцитной взвеси из крови иммунных доноров // Трансфузионная медицина. 1995, №5. С. 32-36.

5. Руководство по трансфузионной медицине / под ред. Е.П. Сведенцова. Киров, 1999.

6. Рыжков С.В., Плоцкий А.Н., Малахов С.Ф. Применение лейкоконцентрата при гнойно-септических заболеваниях // В кн: Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии. СПб. 1995. С. 343-344.

7. Сведенцов Е.П, Туманова Т.В., Деветьярова О.Н., Щеглова О.О., Утемов С.В., Костяев А.А. Криопротекторный раствор для замораживания лейкоцитов при низкой температуре: Патент на изобретение РФ 2290808 // 2007. Бюл. №.1. 8 с.

8. Сведенцов Е.П. Сохранение биологических мембран ядерных клеток крови при температуре –80°С / Е.П. Сведенцов, Т.В. Туманова, А.Н. Худяков, О.О. Зайцева, О.Н. Соломина, С.В. Утемов, Ф.С. Шерстнев // Биологические мембраны. 2008. Т.25, №1. С.23-29.

9. Соломина О.Н., Сведенцов Е.П., Зайцева О.О., Полежаева Т.В., Оводова Р.Г., Головченко В.В., Лаптев Д.С., Худяков А.Н., Степанова Е.С., Оводов Ю.С. Криопротекторные свойства ряда пектинов. Доклады Российской академии наук. 2010. Т. 430, № 4. С. 559-561.

## ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ И ПЛОДОВЫХ ТКАНЕЙ НА ЭПИТЕЛИЗАЦИЮ РАНЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ РОГОВИЦЫ

**Шарлай Т.М., Юрченко Т.Н.**

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

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Лечение больных с повреждением роговой оболочки глаза остается одной из основных медико-биологических задач, имеющих большое социально-экономическое значение.

Даже относительно легкие повреждения роговицы могут приводить к снижению зрения и потере трудоспособности (полной или частичной), особенно если патологический процесс локализуется в оптической зоне или глубоких слоях роговицы, при длительном периоде заболевания, присоединении вторичной инфекции, нарушении трофики ткани. Так, среди инвалидов по зрению 25,4–58,0% стали нетрудоспособными из-за травмы глаз, поэтому необходима разработка профилактических мер, хирургической помощи и вовремя начатое в полном объеме патогенетически обоснованное консервативное лечение.

В настоящее время остается актуальным поиск новых препаратов, действие которых направлено на повышение регенеративных способностей роговицы, нормализацию гомеостатических, метаболических нарушений, поскольку классическая фармакотерапия чаще всего оказывается неэффективной при лечении различных заболеваний роговицы, связанных с дисфункцией клеток эпителия, эндотелия и стромы. В последние годы растет интерес к применению клеток и тканей фетоплацентарного происхождения и их экстрактов (Репин В.С., Сухих Г.Т., 1998; Грищенко В.И., 1999).

Большим шагом вперед было открытие региональных стволовых клеток роговичного эпителия, которые обладают уникальными свойствами к регенерации и самообновлению, а также осуществляют контроль пролиферации и миграции клеток эпителия конъюнктивы.

Были предприняты успешные попытки трансплантации эпителиальных стволовых клеток при различных кератопатиях, химических и термических ожогах, синдроме Стивена-Джонса, трахоме, кератоконъюнктивите. Обнадеживающие результаты получены при лечении эрозии, язв роговицы, буллезной кератопатии, болезни трансплантата, ожогов с помощью трансплантации эпителиальных эндотелиальных клеток роговицы 14–22 недель гестации.

Следует отметить, что получение региональных стволовых эпителиальных клеток является сложной и до конца не изученной задачей, в связи с чем нами была исследована возможность воздействия на травмированную поверхность ткани роговицы криоконсервированных препаратов, полученных на основе экстрактов плаценты и плодовых тканей, на эпителизацию раневой поверхности роговой оболочки, поскольку фетоплацентарные ткани и экстракты, полученные из них, содержат большое количество цитокинов, факторов роста, различных ферментов, а также аналгезирующие и противовоспалительные факторы (Грищенко В.И., Юрченко Т.Н., 2011).

Работу проводили на 24 глазных яблоках 12 кроликов породы Шиншилла возрастом 6–8 месяцев и массой 2,5–3,0 кг. Эффективность препаратов, полученных на основе экстракта плаценты и плодовых тканей, на процесс регенерации искусственного дефекта роговицы исследовали с помощью роговичного теста.

Под местной анестезией 0,5% раствора дикаина с помощью трипана диаметром 5 мм дозировано делали насечку роговицы на 1/3 толщины, после чего поверхностные слои отделяли в пределах насечки.

Кроликам первой группы (6 животных) в правый (опытный) глаз инстиллировали каждые 6 часов по 1–2 капли препарата, приготовленного на основе экстракта плаценты. Экстракт получен по методу разработанному в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины и хранили при температуре -196°С в течение месяца (Гольцев А.Н., Юрченко Т.Н., 2013).

Кроликам второй группы (6 животных) в правый (опытный) глаз инстиллировали каждые 6 часов по 1–2 капли препарата, приготовленного на основе экстрактов плодовых тканей.

Кроликам контрольной группы (12 животных) в левый глаз инстиллировали антисептики.

Через 3, 12, 24, 48, 72 и 96 часов проводили биомикроскопию с использованием флюоресцеина.

Через 3 часа у всех прооперированных животных в месте повреждения четко определялся диск диаметром 5 мм, окрашенный флюоресцеином в ярко-зеленый цвет.

Через 12 часов в первой и второй основных группах наблюдали отек роговицы и точечное свечение флюоресцеина. В контрольной группе во всех 12 левых глазах наблюдали эрозивный дефект 4–5 мм, интенсивно окрашенный флюоресцеином.

В результате последующих наблюдений установлено, что через 48 часов после операции в первой и второй группах у всех оперированных кроликов наблюдали эпителизацию роговичного эпителия. Поверхность роговицы была блестящей, флюоресцеином не окрашена. При этом разницы в сроках эпителизации роговицы у животных первой и второй групп не обнаружено. У контрольной группы животных к этому сроку наблюдения эпителизация определялась только у трех животных. У остальных животных дефект роговицы был окрашен флюоресцеином.

К 72 часам только у трех кроликов контрольной группы мы наблюдали дефект роговицы, окрашенный флюоресцеином.

Через 96 часов после операции при биомикроскопическом исследовании у одного кролика определялся дефект роговичного эпителия.

Таким образом, инстилляция препаратов, приготовленных на основе экстракта плаценты и плодовых тканей, вызывает активизацию репаративных процессов в эпителии роговицы.

Препаратом, содержащим экстракт плаценты, были пролечены 78 пациентов с воспалительными и дистрофическими заболеваниями переднего отрезка глазного яблока.

В результате проведенного лечения роговица стала прозрачной, ее поверхность – блестящей и гладкой, эпителизировались эрозивные дефекты. У больных купировался роговичный синдром. С помощью предложенного метода лечения удалось сократить время пребывания больных на стационарном лечении в среднем на 5 суток. Как в эксперименте, так и при клинических наблюдениях врастания сосудов в роговую оболочку не выявлено.

Можно сделать вывод, что применение препаратов, приготовленных на основе экстрактов плаценты и плодовых тканей, способствует регенерации клеток эпителия роговицы и стромы (кератоцититов), очевидно влияя на эпителиальные лимбальные клетки. Данные препараты не вызывают иммунных реакций. Механизм их действия состоит в активизации репаративных свойств, а за счет факторов, ингибирующих рост вновь образующихся сосудов в роговицы, осуществляется профилактика возникновения васкуляризованных бельм.

**Литература**

1. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. М., 1998. 200 с.

2. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии// Междунар. мед. журнал. 1999. Т.5, №4. С. 6–10.

3. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения / Под общ. ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. Х.: ФОП Бровин А.В., 2011. 232 с.

4. Плацента :криоконсервирование, клиническое применение / Под общ. ред. А.Н. Гольцева, Т.Н. Юрченко. Х.: ФОП Бровин А.В., 2013. 318 с.

# СЕКЦИЯ III

# ВОЗМОЖНОСТИ И РОЛЬ КРИОБАНКОВ В СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ФЛОРЫ И ФАУНЫ

**ПОИСК СПОСОБОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НАПРАВЛЕННЫХ НА СОХРАНЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ИХ ПРОЗРАЧНЫХ ОБОЛОЧЕК**

**Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Абрамова Т.О., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я.**

*ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

*Zona pellucida* (ZP) или прозрачная оболочка играет важнейшую роль в развитии преимплантационного эмбриона и сохраняется у большинства видов млекопитающих до стадии поздней бластоцисты в качестве естественного барьера между зародышем и окружающей средой (Амстиславский С.Я. и др., 1991; Van Soom A. et al., 2010; Рожкова И.Н. и др., 2012). Именно благодаря наличию ZP размер зародыша на ранних стадиях развития у большинства млекопитающих меняется незначительно (Senger P.L., 2003). Успех многих современных репродуктивных технологий, в частности, процедур редеривации и иммуноконтрацепции зависит от свойств и целостности структуры оболочек преимплантационных эмбрионов (Van Soom A. et al., 2010; Брусенцев Е.Ю. и др., 2011; Рожкова И.Н. и др., 2012).

Целью нашего исследования являлся выбор наиболее оптимального способа замораживания и оттаивания преимплантационных эмбрионов, который был бы наименее травматичным для прозрачных оболочек позволяющим сохранить их целостность в ходе процедур криоконсервации.

В рамках данного пилотного проекта, преимплантационные эмбрионы вымывали из самок-доноров мышей линии ICR на стадии 8-клеток и морулы, затем замораживали при помощи программного замораживателя CL 8800 (CryoLogic, Австралия) с использованием либо глицерина, либо этиленгликоля в качестве проникающих криопротекторов, с добавлением, либо без добавления сахарозы, затем производили оттаивание (быстрое или медленное) и культивирование *in vitro* до стадии бластоцисты. В качестве программ размораживания были взяты режимы, предложенные Renard, Babinet (1984): быстрое оттаивание заключалось в помещении соломины в водяную баню на 10 сек при 37$^{o}$C, медленное оттаивание заключалось в нахождении соломины 40 сек при комнатной температуре и последующим помещением ее в водяную баню при 30$^{o}$C. В ходе проведенного исследования было установлено, что как выбор криопротектора, так и способ оттаивания влияет на процент выживания преимплантационных эмбрионов и сохранения целостности их прозрачных оболочек. Самый низкий уровень эффективности при криоконсервации по оценке последующего культивирования *in vitro* наблюдался при быстром оттаивании эмбрионов, замороженных с глицерином без добавления сахарозы. В тоже время медленное оттаивание в сочетании с добавлением сахарозы в качестве второго криопротектора, является наилучшим вариантом для сохранения жизнеспособности эмбрионов и целостности ZP. Особенно выражен этот эффект в тех случаях, когда в качестве основного криопротектора выступает глицерин. Продемонстрировано, что при медленном размораживании эмбрионов, целостность оболочек при всех вариантах эксперимента сохранялась значительно лучше, чем при быстром варианте размораживания.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 13-04-00685, а также проекта РАН № 30.1 программы «Биоразнообразие».

**Литература**

1. Амстиславский С. Я., Максимовский Л. Ф., Воротников М. Т. Методы биотехнологии в практике разведения животных. Новосибирск: Изд-во ИЦиГ, 1991. 170 с.

2. Брусенцев Е. Ю., Напримеров В. А., Амстиславский С. Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 102–113.

3. Рожкова И. Н., Брусенцев Е. Ю., Амстиславский С. Я. Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий // Онтогенез. 2012. № 5. с. 1–11.

4. Renard J. P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant // J. Exp. Zool. 1984. V. 230. № 3. P. 443–448.

5. Senger P. L. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd revised edition. Current Conceptions, Inc. Washington State University Research & Technology Park, Pullman, Washington, 2003.

6. Van Soom A., Wrathall A. E., Herrler A., Nauwynck H. J. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? // Reprod. Fertil. Dev. 2010. V. 22. P. 21–31.

## ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АТФ В СПЕРМЕ БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБИКА ПОСЛЕ РАЗЛИЧНОЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ СПЕРМЫ

**Буцкий К.И., Пуговкин А.Ю.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*
E-mail: kirill_buz@list.ru

Еще в 1986 году разработаны способы криоконсервации спермы карповых рыб (Копейка Е.Ф., 1986), которые могут быть использованы как для сохранения генофонда рыб, так и для выращивания рыб в рыбных хозяйствах. Однако ни один из существующих способов не позволяет получить 100% выживаемости, после замораживания эякулята для большинства пресноводных рыб выживаемость составляет до 50%. Поэтому важной задачей криобиологии является усовершенствование имеющихся способов криоконсервации. Исследователи обычно идут по пути улучшения криозащитной среды и режима охлаждения-отогрева, при этом большое значение имеет также качество нативной спермы.

Для созревания половых клеток каждого вида рыб требуются особые условия среды, свойственные данному виду. Каждый вид рыб отличается условиями нереста и временем созревания половых клеток. Даже при переносе в заведомо благоприятные условия, в которых наблюдается большая скорость роста, у части рыб функция размножения рыб не всегда реализуется. Создание условий, благоприятных для размножения рыб, может быть затруднительно, поэтому в современных рыбных хозяйствах для стимуляции завершающего этапа гаметогенеза используются инъекции гормональных препаратов. Для такой стимуляции наиболее широко используются внутримышечные инъекции гипофиза, разработанные Н.Л. Гербильским еще в 1936 г. Также перспективно использование более новых препаратов на основе гонадотропин-рилизинг гормона, который вводится в значительно меньших дозах и вызывает выделение гонадотропных гормонов гипофизом.

До сих пор еще недостаточно изучено действие гормональных препаратов на метаболизм и морфо-функциональные характеристики сперматозоидов рыб до и после криоконсервирования. Существует много работ (Seifi T. и др., 2011; Kayim M. и др., 2010; Ding и др., 2012) о влиянии некоторых гормонов на характеристики спермы рыб в норме, но есть лишь единичные сообщения о том, как они влияют на криорезистентность сперматозоидов (Kopeika E.F. и др.., 2007).

АТФ необходим для обеспечения жизнеспособности и функционирования любой клетки. У большинства водных видов с наружным оплодотворением, сперматозоиды неподвижны в семенниках и становятся подвижными при попадании во внешнюю среду. Подвижность сперматозоидов рыб осуществляется посредством гидролиза АТФ, синтезированного за счет митохондриального дыхания, основная часть которого запасена перед активацией (G. Perchec и др., 1995). АТФ также затрачивается на поддержание оптимальных для жизнедеятельности концентраций ионов, обеспечивает движение хвоста, что необходимо для успешного оплодотворения.

Цель данной работы – сравнить влияние различной гормональной стимуляции дозревания спермы на концентрацию АТФ в сперме, определить влияние концентрации АТФ на криорезистентность.

Материалы и методы. Исследования проводили на самцах белого толстолобика (Hypophthalmichthys molitrix) на рыбном хозяйстве (пос. Мироновский, Донецкая обл.). Самцов толстолобика удерживали в бассейнах с проточной водой при температуре t = 25 ° С. Средняя масса производителей, которые использовались в исследовании, составляла 4,5 кг. Инъекции проводились утром, сперму получали в сухую чистую посуду через 20-24 часов после инъекций.

Гормональная стимуляция. Для инъекций использовали препараты, которые используются для стимуляции созревания сперматозоидов на рыбных хозяйствах: суспензию гипофиза сазана, сурфагон (МосАгроГен, Россия) - синтетический аналог гонадотропин - рилизинг гормона млекопитающих, сурфагон+метоклопрамид - блокатор дофаминовых рецепторов, коммерческий препарат овопель (Венгрия). Дозировка: гипофиз – 2,5 мг/кг, сурфагон - 1 мкг/кг, сурфагон - 1мкг/кг + метоклопрамид - 5мг/кг, препарат овопель - 0,5 гранулы/кг.

Определение концентрации АТФ. Для определения содержания АТФ в сперме смешивали 0,5 мл спермы с 0,5 мл 10 % $HClO_4$, затем интенсивно перемешивали и быстро охлаждали в жидком азоте. После отогрева до 2-5°С ампулы центрифугировали при 5°С в течение 5 мин при 1000g . Супернатант переносили в другую пробирку, проводили нейтрализацию 2M водным раствором KOH до pH = 7,0 и инкубировали 15 мин при 5°С. Белок в осадке определяли методом Лоури в модификации Миллера. После этого супернатант центрифугировали в течение 5 мин при 1000g. Определение АТФ проводили ферментативным методом с преобразованием НАДН в НАДФН в системе соединенных ферментативных реакций, последовательно добавляли следующие ферменты: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), гексокиназа (ГК) + глюкоза. Среда для определения АТФ содержала 100 мМ трис - HCl, pH 7,0; 4,1 мМ ЭДТА; 2 мМ $MgCl_2$, 4 мМ НАДФ, 25 ед/мл Г6ФДГ, 5 ед/мл. Уровень содержания НАДФН регистрировали спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм. Количество АТФ выражали в нмоль/мг белка.

Криоконсервирование спермы. Сперму разбавляли 1:1 с криозащитной средой (Копейка Е.Ф., 1986) и охлаждали в парах азота за стандартным режимом для криоконсервирования спермы карповых. Для размораживания ампулы переносили на водяную баню с температурой 40°C, постоянно перемешивая воду для улучшения теплообмена, до появления жидкой фазы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок с использованием программ Statsoft Statistica 7.0 и Microsoft Excel. Различия между столбцами с различными символами считать статистически значимыми при $p<0,05$ ($n = 7$).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные об уровне и времени подвижности сперматозоидов, полученных после различных гормональных стимуляций производителей. Показано, что сперма с наибольшим уровнем подвижных клеток получена после стимуляции гормональным препаратом овопель, также высокий уровень подвижных сперматозоидов наблюдался после стимуляции гипофизом. После стимуляции самцов смесью сурфагона + метоклопрамид полученные сперматозоиды имели меньший уровень подвижности. При этом время движения спермы после всех видов стимуляции не имело статистически значимых различий.

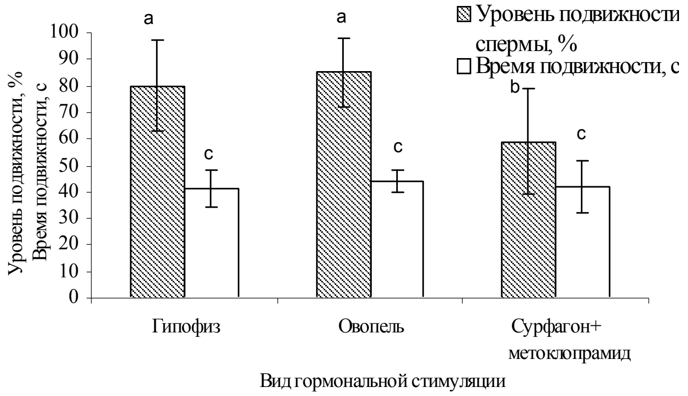



Рис. 1. Время и процент подвижности сперматозоидов белого толстолобика после различной гормональной стимуляции.

Поскольку энергетические характеристики связаны с функциональными характеристиками сперматозоидов, для объяснения различий в уровне подвижности было проведено исследование концентрации АТФ в нативной сперме толстолобика. Как видно на рис. 2 после стимуляции смесью сурфагон+метоклопрамид наблюдается почти вдвое больший уровень АТФ.

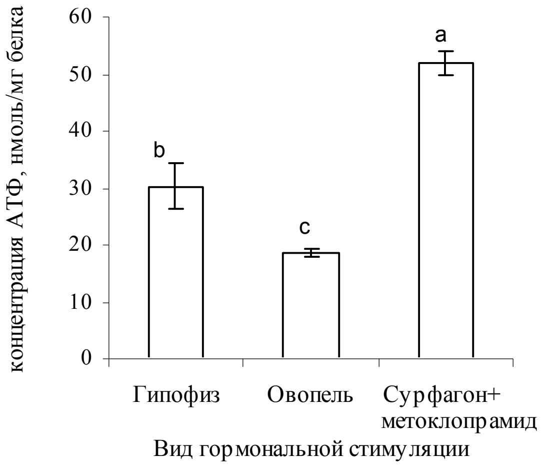



Рис.2. Концентрация АТФ на мг белка в нативной сперме белого толстолобика.

Энергетический запас клетки является одним из важнейших факторов, который влияет на сохранность спермы при неблагоприятных условиях. АТФ необходим сперматозоиду для поддержания подвижности и градиента концентраций ионов на мембране (G. Perchec и др., 1995). В работе (Копейка Е.Ф., 1997) показано снижение уровня АТФ в сперме после криоконсервирования. Поэтому большее количество АТФ в сперме, является причиной большей криорезистентности. Для выяснения причин этих различий необходимы дальнейшие исследования.

Несмотря на то, что в качестве нативной спермы, полученной после различных инъекций, были различия, качество криоконсервированной спермы белого толстолобика не имело значимых различий. Средний уровень подвижности после всех видов стимуляции составил 30%, время движения 45 с, что характерно для результатов криоконсервирования спермы толстолобика. Полученные данные свидетельствуют о различной криорезистентности клеток. Наибольшую криорезистентность имели сперматозоиды, полученные после стимуляции смесью сурфагон+метаклопрамид. При криоконсервации количество АТФ в сперматозоидах снижается (Копейка Е.Ф., 1997), и это снижение при недостаточном количестве АТФ может привести к гибели клеток. Значит, повышение содержания АТФ может приводить к увеличению криорезистентности.

**Выводы.** После гормональной стимуляции белого толстолобика смесью сурфагон+метоклопрамид наблюдается наибольшая концентрация АТФ в сперме, что является одной из причин повышения криорезистентности сперматозоидов. Полученные результаты показывают перспективность использования данного вида стимуляции с целью получения спермы для криоконсервации.

**Литература**

1. Ding F., Milley J.E., Rommens M., Li Ju., Lei Ji., Lall S.P. Effect of hormone implantation on cryopreservation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) sperm // Cryobiology. 2012. №65.P.51-55.

2. Kayim M., Bozkurt Y., Ogretmen F. Comparing the Effectiveness of Ovopel and Carp Puritary Extract (CPE) on Artificial Spawning of Scaly Carp (Cyprinus carpio) // Journal of Animal and Veterinary Advances. 2010. Vol. 9, №20. P.2589-2592.

3. Kopeika E.F., Drokin S.I., Cherepnin V.A., Bekh V.V., Hrytsynyak I.I., Linnik T.P., Ishkov G.S. Experience in obtaining the high-quality of paddlefish sperm and its cryopreservation // «The 1st International Workshop on the Biology of Fish Sperm»: Abstract book. Vodnany, Czech Republic. 2007. P.48-49.

4. Perchec G., C. Jeulin, J. Cosson, F. Andrй, R. Billard Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa // Journal of Cell Science. 1995. №108. P.747-753.

5. Seifi T., Imanpoor M.R, Golpour A. The Effect of Different Hormonal Treatments on Semen Quality Parameters in Cultured and Wild Carp // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2011. №11. P.595-602.

6. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа // М: Изд-во ВНИПРХ. 1986. С.9.

7. Копейка Е.Ф., Черепанов В.В., Дзюба Б.Б. Анализ содержания АТФ и креатинфосфата в сперме карпа (*Cyprinus carpio*) до и после криоконсервации // Проблемы криобиологии. 1997. №4. С.41-45.

# ПЕРСПЕКТИВЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГЕНОПЛАЗМЫ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

**Вержук В. Г., Павлов А. В., Шубин Н.А.**
*ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова,*
*Санкт – Петербург, Россия*
E-mail: vverzhuk@mail.ru
*Институт цитологии РАН, Санкт – Петербург, Россия*
E-mail: Shubin_n@inbox.ru

Необычный мир низких температур постоянно привлекает внимание исследователей из самых различных областей знаний. Яркую характеристику в этом вопросе дал английский физик Фрэнсис Саймон, отметивший, что "… это та область, в которой человек существенно превзошел саму природу" (Simon F. E., 1952). Достижение низких и сверхнизких температур ценно для нас тем, что в этих условиях мы встречаемся с новыми явлениями и фактами, которые помогают проникнуть в суть строения материи, позволяют использовать новые методы исследования; наконец низкие температуры являются важным инструментом технического прогресса, особенно в области новой техники (Шубин Н.А., 2008). В основе достижений лежали работы многочисленных исследователей, изучавших сложные клеточные системы, изменяющиеся под влиянием охлаждения, льдообразования и эффектов, сопровождающих эти процессы. Криоконсервация, вернее криосохранение, - сложный многоэтапный процесс, который проводит экспериментатор с целью сохранить живыми клетки, ткани, органы в глубоком холоде в состоянии анабиоза (скрытой жизни) (Попов А.С., 2008).Ведущей тенденцией криобиологии является отказ от эмпирических принципов исследований, глубокое изучение механизмов криоповреждений и криозащиты, а также разработка на этой основе необходимых и достаточных условий эффективного низкотемпературного консервирования биологических объектов (Грищенко В.И., 2005).

Согласно Конвенции по биоразнообразию, сохранение биологического разнообразия от исчезновения возможно двумя путями: in situ, т.е. в естественных условиях – на полях, в лесах, больших массивах садовых и ягодных насаждений, и ex situ – в заповедниках, коллекционных садах и питомниках, различных генетических банках животных, рыб, растений, микроорганизмов и т.д. (http://www.cbd.int/). Большинство растений может храниться в генетических банках в виде семян, причем вполне достаточно поддерживать небольшую отрицательную температуру, чтобы обеспечить высокую жизнеспособность образцов в течение десятилетий (Филипенко Г.И., 2007). Однако есть группы растений, для которых использование криоконсервации является весьма перспективным – это вегетативно размножаемые культуры, у которых при семенном размножении не сохраняются признаки материнского растения. Поэтому для них выходом является криоконсервация вегетативных частей растений (однолетние вегетативные побеги, почки, пыльца и меристемы) в жидком азоте или его парах при - 183є…-185єС (Forsline F. et al., 1998, Вержук В.Г. и др., 2009).

После завершения строительства криобиохранилища при генетическом банке ВИР в 2004г началась разработка методик криоконсервации частей растений с использованием различных методов замораживания. Исходным материалом послужили сорта коллекции плодовых и ягодных культур, высаженных в садах опытных станций ВИР и ВНИИГ и СПР им. И.В. Мичурина (г. Мичуринск). Совместно с отработкой методик началась закладка образцов коллекции плодовых культур ВИР на длительное хранение в парах азота. Кратко следует сказать об исследовательской работе по криоконсервации растений и результатах, полученных после хранения в жидком азоте отдельных растительных фрагментов. В работе с пыльцой мы сбор и консервацию пыльцы проводили в период бутонизации цветков. Контроль жизнеспособности пыльцы после хранения, осуществляли непосредственно перед работой по опылению сортов, путем проращивания ее на питательной среде. Результаты хранения нескольких лет показали, что жизнеспособность пыльцы не изменяется по сравнению с исходной. Полученные данные по сортам черной смородины указывают, что завязываемость ягод во всех вариантах скрещивания составила 94-100%, что подтверждает эффективность хранения пыльцы в жидком азоте. В ходе исследований по сохранению черенков и почек таких культур как яблоня, груша, вишня, черешня, смородина, черемуха, крыжовник, жимолость были получены положительные результаты. Жизнеспособность черенков и почек после хранения в азоте, с последующей прививкой на взрослые ветви в саду и посадкой в землю (смородина, черемуха, крыжовник и жимолость), была различной и в разные годы составляла от 20,0% - 40,0% до 81,0%. В настоящее время проводится разработка методов криоконсервации с применением на почках плодовых культур криозащитных веществ – криопротекторов (Вержук В.Г., Павлов А.В. и др.,2011). Обработка вегетативных почек перед погружением в азот такими криопротекторами, как глицерин и сахароза показали положительный результат. На примере черемухи обыкновенной (Padus Mill.) жизнеспособность обработанных криопротекторами почек после хранения в азоте составляла от 47,4% до 87,5%.

В заключении необходимо отметить, что применение методов криоконсервации на плодовых культурах дает положительные результаты и их следует применять с целью сохранения генетического разнообразия растений и дальнейшего практического применения. В результате использования и отработки методик криоконсервации пыльцы, черенков и почек началось создание в ВИРе дуплетной коллекции плодовых и ягодных культур.

### Литература


1. Forsline P. I. et al. Recovery und longevity of cryopreserved dormant apple buds // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1998. V. 123. №. 3. P. 365-370.
2. Simon F.E. Low temperature physics Four lectures. London Press, 1952, p. 132.
3. Вержук В.Г., Павлов А.В., и др. Криоконсервация побегов и почек черемухи (Padus Mill.) с применением различных криопротекторов и режимов замораживания. // Сб. научн. тр. посвященных 90-летию со дня рождения Бутенко Р.Г. Киев., 2011, С. 233-237.
4. Вержук В.Г., Филипенко Г.И. и др. Разработка методов криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур // Тр. по прикл. бот. ген. и сел. СПб. ВИР, 2009. Т. 166. С. 353-357.
5. Грищенко В.И. Достижения и развитие криобиологии в Украине. // В кн. Проблемы криобиологии, 2005, 3: 232-233.
6. Попов А.С. Криоконсервация культивируемых клеток. // В кн. Методы культивирования клеток. СПб., 2008, С. 236-250.
7. Филипенко Г.И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР им. Н.И. Вавилова // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. СПб., 2007, Т. 164. С. 263-272.
8. Шубин Н.А. Прикладная криобиология. Криотехника и организация криобанков. // В кн. Методы культивирования клеток. СПб., 2008, С. 250-261.


## КРИОБАНКИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА АМФИБИЙ


**Гахова Э.Н., Утешев В.К., Каурова С.А., Шишова Н.В., Мельникова Е.В.**

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия*

E-mail: gakhova@gmail.com


Одной из серьезных проблем последнего столетия является глобальное и резкое снижение биоразнообразия растений и животных.

Катастрофическое падение видового разнообразия требует принятия безотлагательных действенных мер по спасению растительного и животного мира нашей планеты. В наше время, наряду с традиционными природоохранными подходами, все большее развитие получают новые приемы, такие, как создание криобанков и криоколлекций, в которых в замороженном виде в течение длительного времени могут сохраняться репродуктивные клетки исчезающих видов животных и растений. Такие генетически полноценные клетки в дальнейшем могут быть использованы для поддержания исчезающих популяций или для восстановления исчезнувших видов (Veprintsev, Rott, 1979; Gakhova, 1998; Cryobanking the Genetic Resource, 2001; Uteshev, Gakhova, 2003; Browne R. K. et al., 2011). В исследованиях по криоконсервации геномов животных и растений уже достигнуты определенные успехи. Значительные результаты получены в области криоконсервации семян растений, спермы рыб, спермы и зародышей млекопитающих. В то же время, исследований по длительному сохранению половых клеток амфибий пока немного. Задачей данного сообщения является рассмотрение возможных источников генетического материала амфибий, которые могут быть использованы для криобанкирования.

К настоящему времени разработаны методы криоконсервации только сперматозоидов амфибий. Эксперименты по криоконсервации ооцитов, икры и ранних зародышей амфибий пока не дали положительных результатов. В ранних исследованиях по криоконсервации сперматозоидов амфибий использовали тестикулярную сперму, полученную путем мацерации выделенных семенников травяной лягушки *Rana temporaria* (Каурова С.А. и др., 1996; Kaurova et al., 1997) и тростниковой жабы *Bufo marinus* (Browne et al., 1998). Последующие исследования по криоконсервации тестикулярных сперматозоидов других видов амфибий (Каурова С.А. и др., 2008; Mansour et al., 2009, 2010; Browne and Figiel, 2010) подтвердили перспективность использования тестикулярных сперматозоидов для генетического криобанкирования. Однако, несмотря на то, что были достигнуты определенные успехи в криоконсервации спермы амфибий, существуют определенные ограничения в создании криоколлекций тестикулярной спермы. Они связаны с вынужденным забоем животных, что недопустимо для редких и исчезающих видов.

В дальнейшем, по мере развития представлений по биоэтике, возникла необходимость в поиске новых методов прижизненного получения сперматозоидов амфибий. Появился целый ряд работ (Obringer et al., 2000; Limori et al., 2005; Browne et al. 2006; Hopkins and Herr, 2008; Kouba et al.; 2009; Browne and Figiel, 2010), в которых сперматозоиды бесхвостых амфибий получали прижизненно вместе с уриной путем гормональной стимуляции спермиации (HIS). Возможность получения уринальной спермы амфибий была новым шагом в деле сохранения редких и исчезающих видов. В последние годы появились первые работы по успешной криоконсервации прижизненно полученной уринальной спермы травяной (Shishova et al. 2011) и прудовой лягушек (Uteshev V,K. et al., 2013), серой жабы (Kaurova et al., в печати). Однако, несмотря на перспективность использования HIS для криоконсервации и длительного сохранения геномов амфибий, особенно редких и исчезающих, интерес к исследованию криоконсервации тестикулярной спермы сохраняется. Это вызвано, в первую очередь, отсутствием единой схемы гормональной стимуляции разных видов амфибий с целью получения уринальной спермы и трудностями её криоконсервации.

Альтернативным источником получения сперматозоидов для криоколлекций генофонда амфибий может стать сбор и криоконсервация постмортальных сперматозоидов. Материалом для криоконсервации может служить тестикулярная сперма самцов амфибий, внезапно погибших, как в природе, так и в условиях неволи в зоопарках или частных коллекциях. Однако при внезапной гибели животных не всегда возможно быстро доставить материал в лабораторию с целью его дальнейшей криоконсервации. Поэтому, одним из важнейших, ключевых моментов в работе по криоконсервации данного генетического материала является вопрос длительности сохранения жизнеспособных, функционально полноценных сперматозоидов в семенниках погибших животных. В настоящее время существует ряд работ, подтверждающих возможность использования постмортальной спермы амфибий. Так показано, что выделенные и охлажденные до субнулевых температур сперматозоиды бесхвостых амфибий способны оставаться жизнеспособными в течение недели и дольше. (Browne et al., 2002). Постмортальные сперматозоиды, хранящиеся в тушках умерших животных при $+4^0$C, также в течение нескольких дней сохраняют функциональную активность (Shishova et al. 2013). В то же время, возможность криоконсервации постмортальной тестикулярной спермы амфибий с целью её криобанкирования до настоящего времени не была изучена. В недавно проведенных исследованиях, мы получили успешную криоконсервацию посмортальных тестикулярных сперматозоидов травяной лягушки, хранящихся в тушках животных в холодильнике в течение 1-3 суток (Kaurova et al., в печати).

В вышеперечисленных публикациях описаны результаты получения и криоконсервации сперматозоидов бесхвостых амфибий. В последние годы появились работы по прижизненному получению уринальной спермы некоторых видов хвостатых амфибий. Так, в статье Мансура с соавторами

(Mansour et al., 2010) описаны результаты успешного получения уринальной спермы мексиканского аксолотля *Ambystoma mexicanum.* Эта уринальная сперма была с успехом использована для искусственного оплодотворения ооцитов in vitro. Сходные результаты были получены нами в экспериментах с иглистым испанским тритоном *Pleurodeles waltl* (Uteshev et al., в печати). Недавно появилась первая публикация о криоконсервации сперматофоров мексиканского аксолотля (Figiel, 2013). По-видимому, генетические криобанки скоро пополнятся криоконсервированными сперматозоидами хвостатых амфибий.

Еще одним источником генетического материала для криобанкирования могут служить зародышевые клетки. Известно, что зародышевые клетки амфибий сохраняют полипотентность до стадии бластулы. Имеется целый ряд публикаций об удачных пересадках ядер зародышевых клеток в энуклеированные яйцеклетки (Никитина Л.А., 1996). В наших экспериментах клетки диссоциированных зародышей серой жабы *Bufo bufo* были заморожены до жидкого азота, а после оттаивания пересажены в энуклеированные ооциты. Наблюдали несколько первых дроблений небольшого числа экспериментальных зародышей (Каурова и др., 1998). Таким образом, зародышевые клетки амфибий с полноценным геномом, возможно также будут объектом для генетического криобанкирования.

**Литература**

1. Каурова С.А., Чекурова Н.Р., Мельникова Е.В., Утешев В.К., Гахова Э.Н. 1996. Сохранение оплодотворяющей способности спермы травяной лягушки (Rana temporaria) после криоконсервации. Консервация генетических ресурсов. Пущино, стр. 106-107;

2. Каурова С.А., Никитина Л.А., Утешев В.К., Гахова Э.Н. 1998. Криоконсервация тотипотентных зародышевых клеток амфибий и их использование для реконструкции энуклеированных яйцеклеток. Консервация генетических ресурсов. Пущино, стр. 206-208;

3. Каурова С.А., Утешев В.К., Гахова Э.Н. 2008. Криоконсервация тестикулярных сперматозоидов серой жабы *Bufo bufo*. Консервация генетических ресурсов. Пущино, стр. 62;

4. Kaurova S.A., Uteshev V.K., Chekurova N.R., Gakhova E.N. 1997. Cryopreservation of testis of frog Rana temporaria. Infusionstherapie und Transfusionsmedizin., 24(5), 78-79;

5. Gakhova E.N. 1998. Genetic cryobanks for conservation of biodiversity. The development and current status of this problem in Russia. Cryo-Leters, suppl.1, 57-64;

6. Uteshev V.K., Gakhova E.N. 2005. Gene cryobanks for conservation of endangered amphibian species . Russ. J. Herpetol. (Suppl. Herpetologia Petropolitana). 12, 233-234;

7. Shishova N.R., Uteshev V.K., Kaurova S.A., Brown R.K., Gakhova E.N. 2011. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. Theriogenology, 75, 2, 220-232;

8. Browne R.K., Li H., Robertson H., Uteshev V.K., Shishova N.R., McGinnity D., Nofs S., Figiel C.R., Mansour N, Lloyd R.E., Agnew D., Carleton C.L., Wu M., Gakhova E.N. 2011. Reptile and amphibian conservation through gene banking and other reproduction technologies. Russian Journal of Herpetology. 18, № 3, 165–174.

9. Uteshev V.K., Shishova N.V., Kaurova S.A., Browne R.K. Gakhova E.N. 2012. Hormonal induction of spermatozoa from amphibians with Rana temporaria and Bufo bufo as anuran models. Reprod. Fertil. Dev., V. 24(4), 599-607;

10. Shishova N.V., Uteshev V.K., Sirota N.P., Kuznetsova E.A., Kaurova S.A., Browne R.K. and Gakhova E.N. 2013. The Quality and Fertility of Sperm Collected From European Common Frog (Rana temporaria) Carcasses Refrigerated for up to 7 Days. Zoo Biology 32, 400–406;

11. Uteshev V.K., Shishova N.V., Kaurova S.A., Manokhin A.A., Gakhova E.N. 2013. Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lessonae).* Russian Journal of Herpetology, V.20, № 2, 105-109.

## ДИСПЕРМНЫЙ АНДРОГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ КАК ПОДХОД ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

**Грунина А.С., Цветкова Л.И. *, Пронина Н.Д. *, Рекубратский А.В. ***

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

E-mail: asgrunina@gmail.com

* *Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства, поселок Рыбное, Московская область, Россия*

E-mail: recobra@gmail.com

Индуцированный андрогенез является методом получения организмов, развитие которых происходит под контролем мужских хромосом без участия материнской ядерной наследственности. Для получения диплоидного андрогенеза необходимо вызвать инактивацию ядер яйцеклеток и удвоение (диплоидизацию) мужского хромосомного комплекса.

Индуцированный андрогенез традиционно используется в исследованиях по генетике и биологии развития. Однако наибольшее внимание в настоящее время данный метод привлекает в связи с проблемой сохранения биоразнообразия. С его помощью можно воссоздавать генотипы редких и исчезающих видов из генетического материала спермиев как нативных, так и сохраненных с помощью криоконсервации (Veprintsev, Rott, 1979; Грунина и др., 1990; Penman et al., 1996; Corley-Smith, Brandhorst, 1999). Это представляется особенно важным, поскольку если техника криоконсервации спермы в настоящее время в основном разработана (Suquet et al., 2000), то проблема длительного хранения яйцеклеток и зародышей многих животных, в том числе рыб, являющихся объектами наших исследований, пока не решена (Chao, Liao, 2001).

В результате наших исследований первоначально был разработан метод диплоидного андрогенеза, включающий радиационную инактивацию ядер яйцеклеток и диплоидизацию мужского хромосомного комплекса за счет блокирования первого деления дробления у зародышей с помощью теплового шока. С его использованием были получены жизнеспособные андрогенетические потомства у нескольких видов костистых рыб (Нейфах, Грунина, 1990; Грунина и др., 1990). Однако, полученные с использованием того же метода андрогенетические диплоиды осетровых рыб оказались нежизнеспособны вследствие повышенной чувствительности этих рыб к высокому уровню гомозиготности, возникающей в результате блокирования первого деления дробления (Грунина, Нейфах, 1991). Между тем работы в этой области на осетровых рыбах имеют первостепенное значение, поскольку отдельные виды и популяции этих рыб близки к исчезновению (Birstein et al., 1997).

Учитывая сказанное нами были предприняты исследования по получению диспермного андрогенеза у осетровых рыб. Данный метод предполагает восстановление диплоидности андрогенетических особей за счет слияния хромосомных наборов двух спермиев, что приводит к получению гетерозиготного потомства с обычным уровнем генетической изменчивости. При разработке метода диспермного андрогенеза мы основывались на биологических особенностях осетровых рыб: наличии в яйцеклетках нескольких микропиле, что позволяет проникать в яйцеклетку сразу нескольким спермиям и физиологической моноспермии, подразумевающей отсутствие в яйцеклетках механизмов, блокирующих сверхчисленные спермии (Гинзбург, 1968). В результате, разработанный нами применительно к осетровым рыбам метод диспермного андрогенеза включает генетическую инактивацию яйцеклеток с помощью ионизирующего излучения, оплодотворение облученных яйцеклеток концентрированной спермой и последующую тепловую обработку оплодотворенных яиц, способствующую слиянию ядер спермиев. С применением этого метода нами впервые были получены жизнеспособные андрогенетические потомства у осетровых рыб (Grunina et al., 1995; Recoubratsky et al., 1996), а также, впервые у позвоночных животных, андрогенетические ядерно-цитоплазматические гибриды с использованием яйцеклеток одних и спермиев других видов осетровых рыб (Рекубратский и др., 1998; Грунина, Рекубратский, 2005).

Помимо общебиологического значения получение жизнеспособных андрогенетических гибридов является необходимым условием использования андрогенеза для воссоздания редких и исчезающих видов (Grunina, Neyfakh, 1997). Предполагается, что оплодотворяя нативной или криоконсервированной спермой редкого вида генетически инактивированные яйцеклетки доступного близкого вида и используя метод индуцированного андрогенеза можно восстановить исчезающий вид. Таким образом, успех в получении андрогенетических гибридов позволил нам перейти к исследованиям по применению метода диспермного андрогенеза в сочетании с криоконсервацией спермы.

Первый опыт по получению диспермного андронегеза с использованием криоконсервированной спермы был поставлен на севрюге. Для инактивации ядер яйцеклетки севрюги подвергали рентгеновскому облучению в дозе 220 Гр. Сперма севрюги была заморожена по стандартной методике. В качестве криопротектора применяли метанол (10% от объема разбавителя). В параллельных вариантах опыта использовали нативную сперму этого вида. Для получения андрогенеза порцию облученной икры оплодотворяли размороженной спермой (400С в течение 1 мин), разведенной водой в соотношении 1,5:10. Через 2 мин. икру отмывали от разбавителя и распределяли по чашкам Петри для инкубации. Чтобы вызвать слияние хромосомных наборов спермиев, зародышей через 1.4 - 1.6 τ0 после осеменения подвергали тепловому шоку (370С, 2.5 мин). Для получения диспермного андрогенеза в вариантах с использованием нативной спермы разведение ее проводили, как обычно в этом случае, в соотношении 1:10. Меньшее разбавление криоконсервированной спермы было взято исходя из того, что значительная часть спермиев после замораживания-оттаивания теряет подвижность.

В результате применения теплового шока были получены нормальные жизнеспособные личинки как в вариантах с использованием нативной так и криоконсервированной спермы. В вариантах же без тепловой обработки были получены нежизнеспособные гаплоидные зародыши и предличинки. Таким образом, нами впервые был осуществлен диплоидный андрогенез у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы.

Вместе с тем результаты данного и последующих наших опытов на севрюге показали, что криоконсервация спермы приводит к снижению как ее оплодотворяющей способности так и выживаемости гаплоидных и диплоидных андрогенетических зародышей. Это, по всей видимости, связано с возникновением в спермиях доминантных и/или рецессивных леталей вследствие заморозки.

Далее в опыт была взята икра русского осетра и криоконсервированная или нативная сперма русского и сибирского осетра. Условия опыта были сходными с опытом на севрюге. Однако из-за низкого качества взятой в опыт икры русского осетра андрогенетические диплоиды получены не были, так как все зародыши погибли вскоре после тепловой обработки. В вариантах же без применения теплового шока выживаемость гаплоидных андрогенетических зародышей, развивающихся из криоконсервированных и нативных спермиев, была одинаковой. Это указывает на то, что криоконсервация спермы осетров не вызвала индукции дополнительных рецессивных и доминантных летальных повреждений. Можно предположить, что различия в последствиях криоконсервации спермиев севрюги и осетров обусловлены разным уровнем плоидности этих видов (русский и сибирский осетры – тетраплоидные виды, севрюга – диплоидный вид).

Итак, опыты по получению диспермного андрогенеза у осетровых рыб с использованием криоконсервированной спермы подтверждают возможность применения данного подхода для воссоздания генотипов из генетического материала спермиев.

**Литература**

1. Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М., Наука, 1968. 357 с.

2. Грунина А.С., Гомельский Б.И., Нейфах А.А. Диплоидный андрогенез у карпа// Генетика. 1990. Т. 26. N. 11. С. 2037-2043.

3. Грунина А.С., Нейфах А.А. Индукция диплоидного андрогенеза у сибирского осетра Acipenser baeri Brandt // Онтогенез. 1991. Т. 22. №. 1. С. 53-56.

4. Грунина А.С., Рекубратский А.В. Индуцированный андрогенез у рыб: получение жизнеспособных ядерно-цитоплазматических гибридов // Онтогенез. 2005. Т. 36, №. 3, С. 256—266.

5. Нейфах А.А., Грунина А.С. Получение диплоидного андрогенетического потомства вьюна Misgurnus fossilis L. с помощью теплового шока// Онтогенез. 1990. Т. 21. №. 6. С. 642-645.

6. Рекубратский А.В., Грунина А.С., Мюге Н.С., Нейфах А.А. Получение андрогенетических ядерно-цитоплазматических гибридов у осетровых рыб // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 4. С. 394-400.

7. Birstein V. J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // In: Sturgeon Biodiversity and Conservation. Eds.: V.J. Birstein; J. R. Waldman; W. E. Bemis, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 427-444.

8. Chao N.-H., Liao I.Ch. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos// Aquaculture 2001. V. 197 (1-4) P. 161-189

9. Corley-Smith G.E.; Brandhorst B.P. Preservation of endangered species and populations: a role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis?// Mol. Reprod. Develop. 1999. V. 53, 363-367.

10. Grunina, A.S., Neyfakh, A.A. Induced Diploid Androgenesis // Physiol. Gen. Biol. Rev., 1997. V. 12. P. 73-103.

11. Grunina, A.S., Recoubratsky, A.V., Neyfakh, A.A. Induced diploid androgenesis in sturgeons // The Sturgeon Quart. 1995a. V. 3 N. 3: P. 6-7.

12. Penman, D.J., Myers, J.M., McAndrew, B.J. Restoration of diploid genotypes by androgenesis // Refrigeration and Aquaculture. Proceedings of a Conference, 20-22 March 1996, at Bordeaux, France. P. 469-474.

13. Recoubratsky, A.V., Grunina, A.S., Minin, A.V., Duma, L.N., Neyfakh, A.A. Dispermic androgenesis in Acipenser stellatus // Sturgeon Quart. 1996. V. 4. N.4. P. 12-14.

14. Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J., Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Res. 2000. V. 31. P. 231-243.

15. Veprintsev, B.N., Rott, N.N. Conserving genetic resources of animal species // Nature. 1979. V. 280. P. 633-634.

## *СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВЫХ СПЕКТРОВ У КАРАСЯ СЕРЕБРЯНОГО*

***Гулевский А.К., Релина Л.И., Погожих Е.Г., Грищенкова Е.А.***

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, Харьков, Украина*

*E-mail:* lianaisaakovna@rambler.ru

Рыбы сем. карповых (Cyprinidae) являются распространённым объектом исследований в биологии адаптаций. В период подготовки к неблагоприятному периоду белковый состав тканей и клеток изменяется. «Летние» изоформы частично или полностью заменяются на «зимние». Однако, несмотря на накопленную информацию, перечень белков, претерпевающих сезонные изменения, продолжает пополняться. В связи с вышеизложенным целью данной работы был анализ спектра белков тканей карася серебряного Carassius auratus L. в зависимости от времени года.

**Материалы и методы.** *Животные.* В работе использованы караси из прудов Валковского рыбного хозяйства Харьковской области. Одна группа рыб, выловленных зимой, содержалась в холодовой комнате при температуре воды 4-5°C. Другую группу рыб помещали в аэрируемый аквариум при температуре 20°C не менее чем на 2 недели (процесс, названный нами деакклимацией). Часть рыб, выловленных летом, подвергали поэтапной холодовой акклимации: 7 суток при 7°C, после чего рыб переносили в холодовую камеру с температурой 3°C еще на 7 суток.

*Исследование спектра белков.* Пробы для электрофореза готовили на стандартном Sample-буфере (pH 6,8), и SDS-электрофорез в градиентном 10-25% ПААГе проводили, как описано в (Остерман Л.А., 1981). В работе использованы стандарты молекулярного веса фирмы Fermentas UAB (Литва).

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что в белых мышцах *C. auratus* зимой при деакклимации наблюдается незначительное уменьшение полос 105 и 45 кДа (рис. 1).

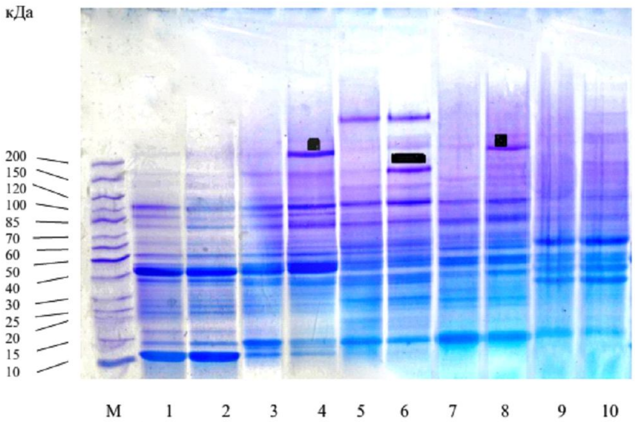



Рисунок 1 - Спектр белков тканей *C. auratus* зимой до и после деакклимации:
М–маркеры молекулярного веса; 1,2 – белые мышцы; 3,4 – красные мышцы; 5,6 – печень; 7,8 – сердце; 9,10 – мозг; 1,3,5,7,9 – деакклимированные рыбы; 2,4,6,8, 10 – «зимние» рыбы.
- белок 172 кДа; - белок 205 кДа

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 (рис. 1).

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.

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. 2). Наши наблюдения по этому поводу согласуются с результатами др. авторов (Vornanen M., 1994), который отмечал наличие одинаковых изоформ тяжелых цепей миозина в миокарде «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 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 (рис. 3). Очевидно, что для изменения состава белков требуется более длительная экспозиция при низкой температуре.

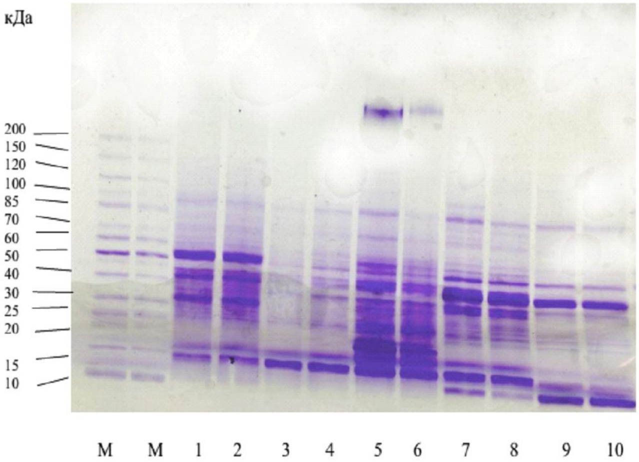



Рисунок 2 - Спектр белков тканей *C. auratus* летом и после деакклимации зимой:
М–маркеры молекулярного веса; 1, 2 – белые мышцы; 3, 4 – красные мышцы; 5, 6 – печень; 7, 8 – сердце; 9, 10 – мозг; 1, 3, 5, 7, 9 – деакклимированные рыбы; 2, 4, 6, 8 – «летние» рыбы.

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**.** 3). *В* печени также исчезает белок 172 кДа. 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.

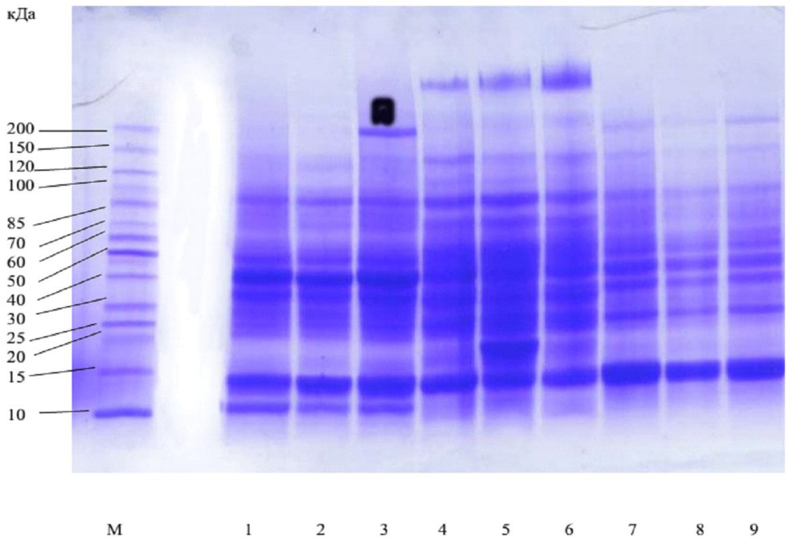



Рисунок 3 - Спектр белков тканей *C. auratus* зимой после деакклимации, летом после холодовой акклимации и весной:

М–маркеры молекулярного веса; 1, 2, 3 – красные мышцы; 4, 5, 6 – печень; 7, 8, 9 – сердце. 1, 4, 7 – деакклимированные рыбы; 2, 5, 8 – «летние» рыбы после 2-недельной холодовой акклимации; 3, 6, 9 - «весенние» рыбы. ■ – белок 205 кДа

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что во время деакклимации *C. auratus* при температуре 20°C зимой меняется спектр белков красных мышц, сердца и печени. Т.к., мы не наблюдали отличий в белковых спектрах «летних» и деакклимированных рыб, можно принять, что условия деакклимации в эксперименте воспроизводили летний режим существования рыб. Холодовая акклимация летом 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.

**Литература**

1. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука. 1981.

2. Vornanen M. Seasonal and temperature-induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts // Amer. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 1994. Vol. 267, № 6 Pt 2. P. 1567—1573.

## ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА СПЕРМУ БЫКОВ

**Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Олексиевич Е.А., Кузьмина Т.И.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия*

E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Высокодисперсный кремнезем (ВДК) является компонентом многих лекарственных средств, также он может использоваться как биологически активное вещество, которое при определенных концентрациях способствует повышению жизнеспособности клеток. Использование ВДК для криоконсервации спермы быков приводило после ее размораживания к повышению подвижности спермы, увеличивало показатели выживаемости клеток и стабилизировало их мембрану. При этом сохранялось большое количество ферментов, принимающих участие в искусственном оплодотворении животных, и это позволяло продлить жизнеспособность сперматозоидов [Чуйко А.А., 2003]. Целью работы явилось изучение влияния высокодисперсного кремнезема на различные функции сперматозоидов быков. В работе была использована свежая сперма, полученная в день эксперимента от быков айрширской и голштинской породы. В экспериментах использовали среду Sp-TALP. Для отмывания спермы от семенной плазмы в среду Sp-TALP добавляли поливинилалкоголь, капацитацию проводили в присутствии BSA. Капацитацию клеток проводили в течение 4 часов при 38.5$^{o}$C, 95 % влажности и 5 % $CO_2$. Для активации акросомной реакции использовали лизофосфатидилхолин в концентрации 100 мкМ, который добавляли к предварительно капацитированным клеткам спермы. Затем после прохождения капацитации или акросомной реакции из каждого экспериментального образца брали по 20 мкл и смешивали клеточную суспензию с 20 мкл свежеприготовленного 750 мкМ раствора хлортетрациклина (ХТЦ). Для окраски клеток раствор ХТЦ готовили на основе среды, содержащей 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина, 20 мМ Трис (pH 7.8). Клетки с ХТЦ инкубировали в течение 10 мин при 38.5 °С, после чего в эту смесь для фиксации добавляли 10 мкл 25% глутаральдегида в 1мМ Трисе (pH 7.8) до конечной концентрации глутеральдегида 0.1%. Данная концентрация фиксатора позволяет флуоресценции оставаться стабильной в течение 2 часов и не оказывает чрезмерного влияния на клетки [Ward C.R., Storey B.T, 1984]. Фиксированные клетки в количестве 15 мкл смешивали с 15 мкл 0.22 М 1,4-диазобициклооктана, растворенного в глицерол/PBS (9:1, v/v). После этого при комнатной температуре 10 мкл суспензии спермы размещали на предметном стекле (делали по 2 капли каждого образца), накрывали покровным стеклом, закрепляя его с помощью бесцветного лака. Препараты наблюдали под флуоресцентном микроскопе Zeiss с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (возбуждение при 400-440 нм и излучение при 470 нм). В каждой группе клетки были оценены и классифицированы по принадлежности к одному из типов окрашивания: с яркой флуоресценцией по всей головке спермы (некапацитированные, акросома-интактные клетки); свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные, акросома-интактные клетки); слабая или отсутствующая флуоресценция всей головки сперматозоида, за исключением тонкой, яркой полосы в экваториальном сегменте (капацитированные, акросома-реактивные клетки).

Ранее на сперме свиней было показано, что применение ВДК в концентрации 0.01, 0.001 и 0.0001 % оказывало положительное влияние на переживаемость спермы после замораживания. Как при добавлении ВДК в среду для замораживания, так и при использовании ВДК в инкубационной среде после размораживания [Ковтун С.И., 2011]. Кроме того, отмечали положительное влияние использования ВДК и на других клетках. На ооцитах свиней добавление ВДК в среду для культивирования клеток приводило к повышению количества и качества созревших ооцитов и полученных эмбрионов [Ковтун С.И., 2012].

В наших экспериментах на сперме быков ВДК использовали в концентрации 0.01, 0.001 и 0.0001 %. Инкубация в течение 4-х часов не приводила к изменению в количестве некапацитированных, акросома-интактных клеток (контрольные клетки) как в отсутствие, так и в присутствие всех изученных концентраций ВДК (рис. 1). Также не изменялся процент сперматозоидов на стадии акросомной реакции при инкубации клеток в течение 4-х часов в присутствии ВДК в концентрации 0.01, 0.001 и 0.0001 %. В то же время через 4 часа инкубации было отмечено, что достоверное увеличение числа капацитированных клеток присутствует при использовании ВДК в концентрации 0.001 %. При добавлении ВДК в концентрации 0.01 и 0.0001 % не отмечали увеличение количества капацитированных клеток.

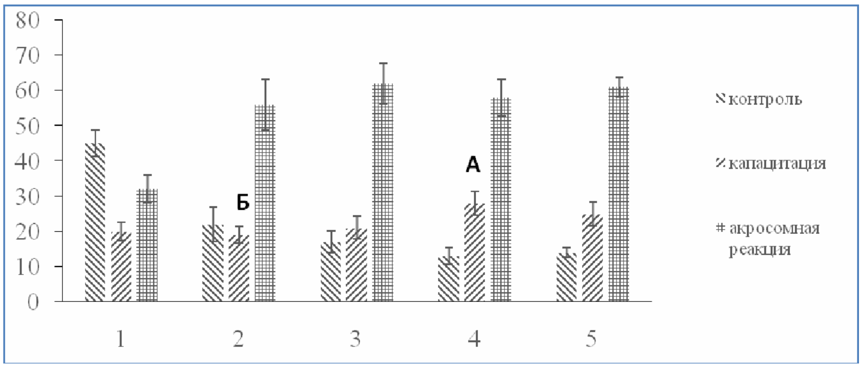



Рис. 1. Влияние различных концентраций ВДК на капацитацию спермы быков. По горизонтали – 1 – контроль на 0 часов; 2 – контроль через 4 часа инкубации; 3 – действие ВДК в концентрации 0.01 %; 4 – действие ВДК в концентрации 0,001 %; 5 – действие ВДК в концентрации 0,0001 %. По вертикали – процентное содержание капацитированных клеток. Различия достоверны при: а,б - $P<0.05$.

Обработка капацитированных в течение 4-х часов сперматозоидов быков лизофосфатидилхолином стимулирует в клетках акросомную реакцию. После обработки лизофосфатидилхолином в течение 30 мин в сперме изучали распределение клеток на три фракции: контрольные, капацитированные и на стадии акросомной реакции в присутствии и отсутствии различных концентраций ВДК (0.01, 0.001 и 0.0001 %). Показано, что в обработанных лизофосфатидилхолином сперматозоидах снижение в количестве некапацитированных, акросома-интактных клеток (контрольные клетки) было отмечено только при инкубации в присутствии ВДК в концентрации 0.001 % и отсутствовало при других концентрация ВДК (рис.2). При изучении влияния ВДК на капацитацию и акросомную реакцию в обработанной лизофосфатидилхолином сперме быков отмечали, что добавление различных концентраций ВДК - 0.01, 0.001 и 0.0001 % не стимулировало изменение концентрации клеток, находящихся на стадии капацитации и акросомной реакции.

Таким образом, при добавлении в среду инкубации высокодисперсного кремнезема в сперматозоидах быков отмечается увеличение количества капацитированных клеток, в то время как на процентное содержание сперматозоидов на стадии акросомной реакции ВДК не влиял.

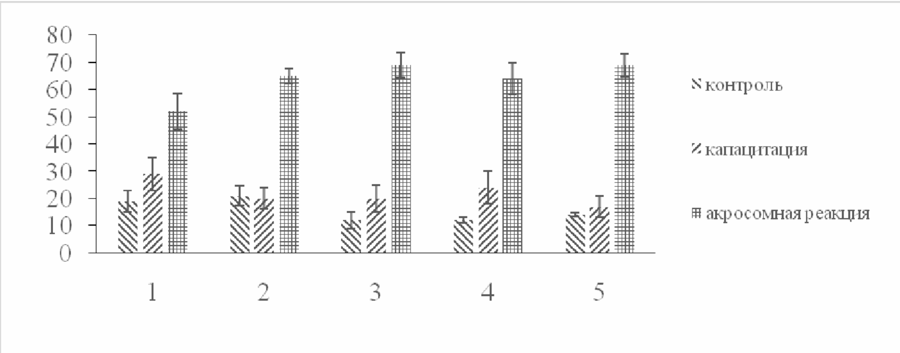



Рис. 2. Влияние различных концентраций ВДК на акросомную реакцию в сперме быков (все клетки предварительно обработаны LPC). По горизонтали – 1 – контроль на 0 часов; 2 – контроль через 4 часа инкубации; 3 – действие ВДК в концентрации 0.01 %; 4 – действие ВДК в концентрации 0,001 %; 5 – действие ВДК в концентрации 0,0001 %. По вертикали – процентное содержание акросомных клеток.

**Литература**

1. Ward C.R., Storey B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. Dev. Biol. 1984. 104. 287-296.

2. Ковтун С.И., Галаган Н.П., Клименко Н.Ю. Использование нанобиоматериалов в технологии криоконсервации генетических ресурсов животных. Тез. Научн. конференции. Максимовка. 2011. С. 386-390.

3. Ковтун С.И., Щербак О.И., Зюзюн А.Б., Троцкий П.А., Галицкая Т.В. Использование нанобиоматериалов дл\ эффективного получения эмбрионов свиней in vitro.Тез. научн. конференции. Киев. 2012. С. 513-518.

4. Чуйко А.А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Киев. 2003. С. 1-415.

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ РЕГИДРАТАЦИИ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН ЗВЕРОБОЯ ЖЕСТКОВОЛОСИСТОГО *HYPERICUM HIRSUTUM* ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

**Левицкая Г.Е.**

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия*

E-mail: levitskaya_g@mail.ru

В настоящее время криоконсервация при ультранизких температурах считается перспективным методом длительного хранения семян, во многих странах созданы криобанки семян (Тихонова В.Л., 1999). Данные о результатах длительного хранения семян в жидком азоте пока весьма немногочисленны. Что касается кратковременной криоконсервации, то большинство ортодоксальных семян хорошо её переносят, но семена некоторых видов чувствительны к воздействию жидкого азота. При созревании ортодоксальных семян их влажность снижается многократно – до 5-15%. Благодаря низкому содержанию воды уже в комнатных условиях температуры и влажности, клеточный матрикс ортодоксальных семян находится в витрифицированном состоянии – состоянии стекла (Walters C. et all., 2005). Неглубокое замораживание семян не вызывает изменения его состояния. При температуре ниже -100°С происходит дегидратация мембран (Белоус, Грищенко, 1994), что изменяет организацию их бислойной структуры и повышает температуру фазового перехода жидкий кристалл-гель, ведущую к нарушению барьерных свойств (Хукстра Ф.А., Головина Е.А., 1999). Устойчивость к криоконсервации зависит от способности к восстановлению мембран после оттаивания и условий регидратации (Белоус А.М., Грищенко, 1994). Известно, что если сухие семена поместить в холодную воду, то при регидратации возможно повреждение мембран; если перед набуханием выдержать сухие семена в парах воды или прогреть, то мембраны будут меньше повреждаться и жизнеспособность семян сохранится (Хукстра Ф.А., Головина Е.А., 1999). К сожалению, большинство исследователей в своих публикациях не описывают условий регидратации семян после их криоконсервации в жидком азоте.

Проведённый нами мониторинг жизнеспособности семян Зверобоя жестковолосистого (*Hypericum hirsutum* L.) после 1 месяца, 3, 6 и 9 лет хранения в жидком азоте и при температуре 5°С показал, что после криоконсервации в течение 1 месяца всхожесть семян статистически достоверно уменьшалась, после 3-х лет хранения в жидком азоте всхожесть снижалась сильнее, после 6 лет всхожесть снижалась еще более значительно - в 2 раза по сравнению с исходной, но после 9 лет хранения величина всхожести (% семян с проросшим корешком) была выше предыдущего значения (табл.). Дальнейшее наблюдение показало, что из 86 % проростков нормально развивались только 7,5% (от выборки семян 200 штук).

Наблюдаемое снижение всхожести (% проклюнувшихся семян) после хранения семян в ЖА в течение 1 мес., 3 и 6 лет, но сохранение её на уровне исходного после 9 лет хранения, привело к предположению, что снижение всхожести связано с повышенной чувствительностью семян, прошедших криоконсервацию, к условиям регидратации и набухания. Сравнение температуры регидратации и набухания семян после разных сроков хранения в жидком азоте подтвердило это предположение (табл.). Стратификация при

3°С (после 6 ч. набухания при 22°С) приводила к ещё большему снижению всхожести семян, прошедших криоконсервацию, но практически не влияла на всхожесть семян, хранившихся при 5°С.

Таблица.

Лабораторная всхожесть* семян *Hypericum hirsutum,* хранившихся при -196 и 5°С, в зависимости от срока хранения и температуры набухания при проращивании, (%).

| Исходная | Срок хранения | Температура хранения, °С | | Температура набухания (°С) в течение 1 суток | Температура проращивания, °С |
|---|---|---|---|---|---|
| | | -196 (жидкий азот) | 5 | | |
| 86.0±3.2 | 1 мес. | 75.5±1.3 | - | 20 | 19-21 |
| | 3 г. | 67.5±2.8 | 85.0±2.4 | 14 | 16-20 |
| | 6 лет | 39.5±4.5 | 89.0±2.4 | [22 - 6 ч, 4 – 2 нед.] | 21-24 |
| | 9 лет | 86.0±2.2 (9) | 79.0±5.0 (33) | 20 | 23-25 |
| | | 75.5±3.9 (71.0) | 88.0±1.4 (82.5) | 23 | 23-25 |

Влажность семян в момент закладки на хранение составляла 6,5 %.

* определена как % семян с проросшим корешком от выборки 4x50 штук;

(…) – количество нормально развивающихся проростков (% от выборки семян), определялось только после 9-летнего хранения; […] – после 6 ч набухания при 22°С применялась холодная стратификация 2 нед. при 4°С.

Одинаковые результаты по всхожести исходных и оттаянных семян после девятилетнего хранения в жидком азоте объясняются тем, что температурные условия (20°С) регидратации и набухания были одинаковыми. Снижение всхожести оттаянных семян после 3- и 6-летнего хранения можно объяснить тем, что регидратация и набухание осуществляли при более низкой температуре (табл.).

Повышение температуры регидратации и набухания семян, хранившихся 9 лет, на 3° (с 20 до 23°С) привело к многократному увеличению количества нормальных проростков (табл.).

Увлажнение в парах воды (3 суток при температуре 24°С и относительной влажности воздуха 65%) семян, хранившихся 9 лет в жидком азоте, увеличило количество нормальных проростков в 2 раза – с 9 до 21,5 %. Этот эффект был значительно ниже, чем при повышении температуры всего на 3°С.

Опыты показали, что экспозиция семян при 22°С в течение 6 часов с момента увлажнения до начала холодной стратификации недостаточна для восстановления клеток меристемы семян после 6 лет хранения в жидком азоте. Вероятно, повышенная температура необходима не только для восстановления мембран, но и последующей репарации других повреждений, для чего необходим более длительный срок экспозиции семян при повышенной температуре.

В наших опытах повышение температуры регидратации и набухания семян на 3° многократно повысило всхожесть, в то время как ГОСТ по определению всхожести семян сельскохозяйственных культур (Семена …, 1985) допускает колебания температуры проращивания на 4° (температура набухания не выделяется). Следовательно, высокую чувствительность семян, прошедших криоконсервацию, к температуре регидратации и набухания необходимо учитывать при оценке влияния криоконсервации. Пониженную температуру регидратации и набухания можно использовать для выявления криочувствительных семян.

Таким образом, срок и условия пребывания семян с момента извлечения из жидкого азота до начала проращивания могут иметь значение для оценки влияния криоконсервации. Повышение температуры и уменьшение градиента влажности при регидратации криочувствительных семян после криоконсервации могут повышать всхожесть и улучшать динамику прорастания.

**Литература**


1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев, 1994. 430 с.
2. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. ГоСт 12038-84. М., 1985. 58 с.
3. Тихонова В.Л. Долговременное хранение семян // Физиология растений, 1999. Т. 46, 3. С. 467-476.
4. Хукстра Ф.А., Головина Е.А. Поведение мембран при дегидратации и устойчивость ангидробиотических организмов к обезвоживанию // Физиология растений, 1999. Т. 46, № 3. С. 347-361.
5. Walters C., Hill L.M., Wheeler L.J. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms // Integr. Comp. Biol. 2005. V. 45. P. 751–758.

# ПЕРСПЕКТИВЫ КРИОСОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЗООЛОГИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ ЕАРАЗА.

**Малёв А.В[1]., Максудов Г.Ю.[2], Гильмутдинов Р.Я.[3], Кудактин А.Н.[4], Бабенков В.Ю.[5], Мельников Н.С.[6] , Ежов И.В.[1], Савельев А.П. [7]**

*[1]МБУК «Казанский зооботсад», Казань, Россия; [2]ГАУ «Московский зоопарк», Москва, Россия;[3]КГАВМ,Казань, Россия;[4]Институт экологии горных территорий КБНЦ РАН,*
*Нальчик, Россия; [5]ВНИИплем, Лесные Поляны,Московская обл.. Россия;*
*[6]МБУК «Екатеринбургский зоопарк», Екатеринбург, Россия. 7ГНУ «ВНИИ охотничьего хозяйства и звероводстваим.проф.Б.М.Житкова», Киров, Россия*
E-mail: al.malev@mail.ru

В коллекциях зоопарков-членов ЕАРАЗА (Инф. сборн. ЕАРАЗА, 2013) на 01.01.2013 года содержалось 3587 видов и подвидов животных, из них 2197 таксон (61,3 %) включен в Международную Красную книгу МСОП (IUCN 2013). Поскольку в зоопарках вид, как правило, представлен не одной, а несколькими особями, очевидно, что зоопарки занимают одно из ведущих мест как по количеству, так и по разнообразию сохраняемого генофонда редких видов. Как видно из таблицы, количество экземпляров животных в зоологических коллекциях насчитывает тысячи особей. Их генофонд представляет собой государственную ценность, стратегический ресурс биоразнообразия. Он может быть использован для усиления жизнеспособности малочисленных популяций в дикой природе или для восстановления былого ареала через искусственное расселение животных (Савельев А.П. 2013). Кроме того, по сравнению с особями в природе (*in vivo*), животные в зооучреждениях доступны, обеспечены ветеринарным обслуживанием, наблюдением, сбалансированным питанием. Срок жизни особей в зооучреждениях обычно больше.

Из табл. видно, что в размножении участвуют далеко не все содержащиеся в неволе виды. В том числе и краснокнижные. Следовательно, при многих преимуществах сохранения генофонда *in vivo*, генетическая эрозия коллекций происходит постоянно, как из-за гибели, так и из-за отсутствия потомства у отдельных особей. При нарастающих темпах вымирания видов и угрозы нарушения биоразнообразия Земли это недопустимо. Необходимо искать альтернативные методы сохранения генетический информации.

Таблица.
Некоторые данные о зоологических коллекциях учреждений ЕАРАЗА,
по состоянию на 01.01.2013 г.

| Таксоны | Всего видов и подвидов. Число и в процентах от общего числа видов в коллекциях | Видов в Красной Книге МСОП. Число и в процентах от общего числа видов таксона в коллекциях | Размножалось видов и подвидов. Число и в процентах от общего числа видов в коллекциях | Размножалось видов из Красной Книги МСОП. Число и в процентах от числа краснокнижных видов в коллециях | Количество экземпляров животных, по таксонам |
|---|---|---|---|---|---|
| Рыбы | 978 (27%) | 281 (28,7%) | 220 (18%) | 65 (29,5%) | 81 336 |
| Амфибии | 177 (5%) | 164 (92,6%) | 53 (30%) | 52 (98%) | 5 162 |
| Рептилии | 918 (26%) | 313 (34%) | 252 (20%) | 82 (26%) | 9 096 |
| Птицы | 870 (24%) | 840 (96,5%) | 351 (27,5%) | 341 (40,6 %) | 30 479 |
| Млекопи-тающие | 644 (18) | 599 (93%) | 381 (59%) | 349 (91.6%) | 23 636 |
| Всего | 3 587 | 2 197 (61,3%) | 1 217 (34%) | 889 (73%) | - |

Современные вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) и методы криобиологии позволяют организовать сбор гамет и гонад от живых и павших животных из зоологических коллекций и хранение их генетических ресурсов в криобанке (Бабенков В.Ю., с соавт 1997; Максудов Г.Ю. с соавт. 2011a; Максудов Г.Ю. с соавт., 2011b; Малёв А.В. с соавт., 2011; Малёв А.В. с соавт., 2013a; Малёв А.В. с соавт., 2013b). Криобанки есть так же компонент управления генетическими структурами искусственных (и, отчасти, естественных) популяций (Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. 1991), в том числе через методики ВРТ (Малёв А.В. с соавт., 2013a; Малёв А.В. с соавт., 2013b). В учреждениях ЕАРАЗА совместно с другими научными организациями в настоящее время проводятся работы по адаптации технологий ВРТ и отработке методов использования генетического криоматериала для восстановления редких видов животных (Максудов Г.Ю. с соавт. 2011a; Малёв А.В. с соавт., 2011; Малёв А.В. с соавт., 2013b). В частности, летом 2013 г. в рамках трехстороннего договора о научном сотрудничестве между Московским зоопарком, Казанским зооботсадом и ВНИИОЗ была проведена первая серия искусственных осеменений бурых медведиц криоконсервированной спермой от нескольких содержащихся в неволе медведей. (Малёв с соавт , in press). (рис. 1, рис. 2).

Нами накоплен опыт работы по криоконсервации гамет и сохранению постмортального семени кошачьих, куньих, медвежьих, копытных, криоконсервации спермы ряда видов птиц. (Максудов Г.Ю. с соавт., 2011b; Малёв А.В. с соавт., 2013a) (рис. 3, рис. 4).

Рис.1. Подготовка к электроэякуляции бурого медведя. Фото С. Курбашкиной

Рис. 2. Подоготовка к искусственному осеменению медведицы. Фото С. Курбашкиной

Для дальнейшего развития этих работ желательно разработать программу сотрудничества по комплектованию криобанков генофонда содержащихся в зооучреждениях ЕАРАЗА животных, в том числе оптимизировать сбор и сохранение гамет павших животных; создать мобильную группу специалистов по сбору и криоконсервации половых продуктов животных в зоопарках; разработать рекомендации по использованию криоконсервированного генетического материала для поддержания искусственных популяций редких видов в зоопарках, с перспективами реинтродукции в природу полученных особей.

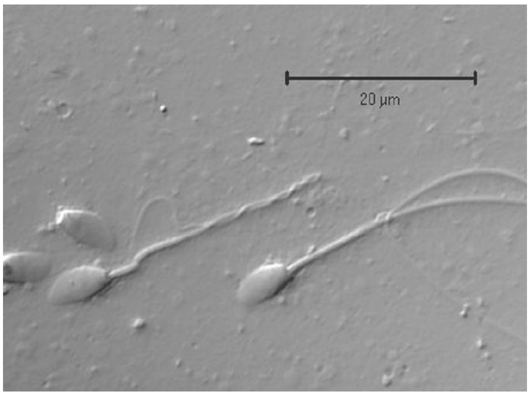



Рис. 3. Постмортальные сперматозоиды кианга. Конфокальная микроскопия.
Фото. Н. Шишовой.

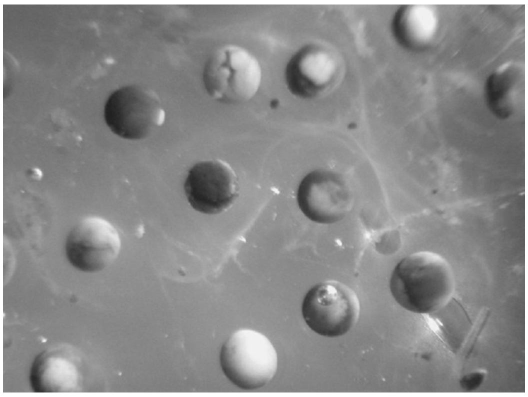


Рис. 4. Клетки бластулы квакши *Agalychnis callidryas* перед криоконсервацией/ Фото Г. Максудова. х 40.

Учитывая, что зоологические учреждения ЕАРАЗА находятся на значительном удалении друг от друга (3), считаем, что наиболее перспективно как с технических, так и с экономических позиций организовать сбор и криоконсервирование репродуктивного материала от животных из коллекций в региональных филиалах, например: Чешская Республика, Казахстан, Белоруссия, Россия (от её европейской части и Кавказа до Камчатки), там, где есть необходимое оборудование для криоконсервации и квалифицированный персонал. Собранный и зафиксированный криоматериал из регионов следует, во избежание форсмажорных потерь, частично сохранять на местах (если есть возможность), а частично транспортировать для дальнейшего хранения и работы в центральный криобанк. Его можно создать как на базе криобанка Московского зоопарка (там на 01.03.2014 собран криоматериал от 36 видов животных), так и в Казани или другом научном биологическом центре России.

Такой подход позволит оперативно и качественно получать, сохранять и использовать образцы, что особенно важно при постмортальных процедурах, лимитированных 2-3 сутками сохранения жизнеспособности гамет. Особую ценность и востребованность имеют животные, внесенные в красные книги разных уровней, необходимость сохранения генофонда которых с каждым годом возрастает из-за угрозы вымирания. Резюмируя, можно с уверенностью утверждать, что проведение работ по криосохранению генетических ресурсов из ценнейшей коллекции редких животных ЕАРАЗА чрезвычайно важно. Эта работа – для будущих поколений. И она требует действенной государственной и спонсорской поддержки, точно так же, как работы по сохранению в природе и неволе харизматичных видов – амурского тигра, переднеазиатского леопарда, лошади Пржевальского и других прекрасных представителей дикой фауны России.

Такие работы особенно значимы в год 50-летия создания Красной книги МСОП, своего рода «барометра жизни» на Земле (IUCN 2013).

**Литература**

1. Бабенков В.Ю., Кыса И.С.,Бабенкова Л.В., Сивая Н.Н., Вестфаль Я. Влияние различных способов криоконсервации и деконсервации эмбрионов на их жизнеспособность. // Матер. Міжнар. науково-виробн. конф. "Використаннятрансплантаціiембріонів все-лекціii відтворенні с.-х. тварин". Киев: Аскания-Нова, 1997. С. 6-7.

2. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. 1991. Стратегия сохранения животного и растительного мира Земли.-Консервация генетических ресурсов. Методы, проблемы, перспективы Пущино. ОНТИ НЦБИ: 5-18.

3. Информационный сборник ЕАРАЗА, выпуск №32,т.2, Москва, 2013, 450 с.

4. Максудов Г.Ю., Малёв А.В., Бронюкова И.Ю., Давыдов Д.А., Шишова Н.В., Тауженова Т.В., Мельников Н.С. Получение и криоконсервация спермы белого медведя Ursusmaritimus. // Материалы Международного совещания (IX Съезд Териологического общества приРАН) «Териофауна России и сопредельных территорий». М.: Товарищество научных изданий КМК. 2011a, С. 292.

5. Максудов Г.Ю., Шишова Н.В., Малёв А.В., АбиловА.И.Постмортальное семя как дополнительный ресурс для сохранения генофонда редких видов. // Материалы научной конференции «Технологии сохранения редких видов животных». М.: Товарищество научных изданий КМК. 2011b, С. 30.

6. Малёв А.В., Максудов Г.Ю. , Меньшинина Е.С., Бронюкова И.Ю., Шишова Н.В., Герасичкин В.Г. Использование вспомогательных репродуктивных технологий при создании криобанка семейства Медвежьи (Ursidae). //Технологии сохранения редких видов животных. Материалы науч. конф. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2011, С. 31.

7. Малёв А.В., Максудов Г.Ю., Гильмутдинов Р.Я., Таужанова Т.В., Ежов И.В., Шишова Н.В. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) в системе зоопарков ЕАРАЗА. // Материалы Всеросс. науч.-практич. конф. «Пять лет зоопарку Удмуртии: реальность и перспективы». Ижевск, 2013а, С. 274-287.

8. Малёв А.В., Максудов Г.Ю., Гильмутдинов Р.Я., Шишова Н.В., Меньшинина Е.С., Герасичкин В.Г., Бронюкова И.Ю., Ежов И.В., Кудактин А.Н., Черепанов И.Н.Возможности использования современных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) при решении проблем сохранения биологического разнообразия семейства Медвежьи (*Ursidae*). //Научное и кадровое обеспечение инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы Межд. науч.конф. Ученые записки КГАВМ, т. 215, Казань, 2013b, С. 212-217.

9. Савельев А.П. Искусственное расселение животных: новые вызовы для давнишней технологии // Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России. Матер. 5-й Межд. науч.-практ. конф. М., 2013. С.74-77.

10. IUCN 2013. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <http://www.iucnredlist.org>.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ЭМБРИОНЫ ЛЯЛИУСА (*COLISA LALIA* HAMILTON–BUCHANAN, 1822)

**Миксон К.Б., Ревенко Е.Б., Гапон А.А.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: kmikson@ukr.net, cryo@online.kharkov.ua

Решение проблемы криоконсервирования ооцитов и эмбрионов рыб может позволить создать страховые запасы гамет и эмбрионов ценных и промысловых видов рыб, а также предотвратить их исчезновение в результате массовых эпизоотий (Bart, 2000). Особенно это важно для редких и исчезающих видов (Tiersch T.R., Mazik P.M., 2000). Большую пользу результаты исследований могут принести при селекции промысловых видов, для получения товарной личинки в любое время года независимо от их нерестовых периодов.

Однако, несмотря на большое количество работ, связанных с попытками криоконсервирования эмбрионов и ооцитов рыб, проблема до сих пор не решена (Gwo J.C., 2000, Tian Y.S. et al., 2003, Zhang T.T., 2004). Сложность заключается в устройстве эмбрионов рыб: крупные размеры, гетерогенность сложно устроенных многослойных мембранных комплексов, а также низкая проницаемость мембран желточного синцития и чувствительность эмбрионов к переохлаждению (Hagedorn M. et al. 1997, Isaeva A. et al., 2004).

Попытки криоконсервирования эмбрионов рыб традиционными методами в средах с низкими концентрациями криопротекторов и низкими скоростями охлаждения не дали надежных результатов (Hagedorn M. et al, 2004). Поэтому большинство исследователей считают перспективным применение процедур витрификации (Robles V. et al, 2003, Миксон К.Б. и др, 2009). Одним из путей, позволяющим исключить проблему «температурного шока» и образование кристаллов льда, является изменение скорости охлаждения. Когда эмбрионы проходят через порог чувствительности быстро, клетки меньше повреждаются. Последние исследования в криобиологии предполагают метод витрификационной сохранности эмбрионов, который упрощает технику глубоко охлаждения (Rall, 1993).

Подготовка биообъекта к глубокому охлаждению включает в себя инкубацию в криозащитных средах, содержащих как проникающие, так и не проникающие компоненты. В результате большая часть эмбрионов погибает уже на предварительном этапе, когда криопротекторы добавляют в среду, где проводится инкубация вследствиие нарушения осмотического равновесия в системе «клетка – окружающий раствор» (Petrunkina A.M., 2007), который также может оказывать токсичное воздействие (Bart A.N, 2000).

Возникает необходимость не только в новых подходах к решению этой задачи, но и в поиске криопротекторов обладающих наименьшим негативным влиянием для рекомендации их в состав криозащитных сред. Ряд авторов пришли к выводу о необходимости использования многокомпонентных криозащитных сред с высокой концентрацией криопротекторов и изменении скорости охлаждения до сверхбыстрых, для создания условий стеклования (Миксон К.Б. и др., 2009, Миксон К.Б., и др. 2008, Ding F.H. et al, 2007). При этом процесс криоконсервирования эмбрионов рыб включает в себя серию комплексных параметров, где проблему динамики транспорта воды и криопротекторов между эмбрионом и внешней средой необходимо решать в первую очередь (Bart A.N., 2000), что напрямую связано с использованием криопротекторов.

Цель исследования – оценить влияние криопротекторов на выживаемость и тератогенность эмбрионов лялиуса, для рекомендации их в состав многокомпанентных криозащитных сред.

**Материалы и методы.** Половозрелых лялиусов возрастом от 8 до 10 месяцев отбирали из частных коллекций. Предпочтение отдавалось особям с номинальным окрасом и конституцией с ярко выраженным половым диморфизмом и нормальной активностью (Richter H-J.,1979). Самцов и самок содержали в общей группе в стеклянных контейнерах объемом 50 л. Перед нерестом самцов и самок рассаживали на 510 дней. Для нереста использовали стеклянные емкости объемом ~ 10 л с умягченной водой. Подготовленных производителей сажали попарно и температуру плавно повышали до 28°С, что являлось стимуляцией к нересту. Как правило, нерест наступал на вторые-третьи сутки. Оплодотворенную икру собирали микропипеткой. За развитием оплодотворенной икры и эмбрионов наблюдали при постоянной температуре от 28-30°С.

Возраст стадий определяли визуально с помощью микроскопа МБС–9 соответственно картам эмбрионального развития (Миксон К.Б., 2009).

В работе исследовалось влияние криопротекторов ПЭО-1500, 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,4-БД, 2,3-БД, ЭГ, ЭТ (полиэтиленоксид, пропандиол, бутандиол, этиленгликоль, этанол, соответственно) в концентрациях 10% и раствор сахарозы в концентрации 10% на выживаемость эмбрионов лялиуса на стадии развития соответствующей биению сердца. Время инкубации эмбрионов в криопротекторах составляло 60 мин.

Тератогенность, вызванная влиянием криопротекторов на эмбриональное развитие оценивалась визуально, в соответствии с ранее составленными картами эмбрионального развития для этого вида (Миксон К.Б., 2009). Соответствующие стадии развития и анормальность фиксировались фотоизображениями.

Анализ результатов был проведен с помощью пакета прикладных компьютерных программ “STATISTICA”. Статистически значимыми различия между сравниваемыми группами во всех случаях считали при $p<0,05$ ($n=7$). Статистически значимые различия определены между группами, которые не имеют одинаковых символов.

**Результаты и обсуждение.** В исследованиях резистентности эмбрионов рыб при подготовке к глубокому охлаждению в составе криозащитных сред обычно используются такие криопротекторы как ДМСО, Мет, Гл, ЭГ в диапазоне концентраций 1-2М. В нашей работе были задействованы криопротекторы разных систематических групп для создания общей картины их влияния на выживаемость эмбрионов.

Ранее было показано, что эмбрионы поддерживают способность к дальнейшему развитию при инкубировании в растворах этих криопротекторах от 30 до 60 мин при температуре от 0°С до комнатной (Миксон К.Б. и др., 2008, Liu K.C. et al, 1993, Zhang T.T. & Rawson D.M. 1998).

В работе (Bart A.N., 2000) эмбрионы карася на стадиях развития, соответствующих образованию сомитов инкубировались в растворах ДМСО и Гл с постепенным повышением концентрации до 10% в течение 20 мин. Было установлено, что уровень выживаемости составил 50% для раствора ДМСО и 30% для раствора Гл. Эти показатели выше, чем в наших экспериментах, что, по-видимому, связано с непродолжительным временем инкубации в криопротекторах. Однако, при повышении концентрации криопротекторов от 12 до 15% и продлении времени инкубации до 50 мин уровень выживаемости резко снижался в ДМСО до 25%, и в Гл 21% соответственно.

Нами было установлено, что Мет, Гл и ДМСО в концентрации 10% снижают уровень выживаемости эмбрионов лялиуса при инкубировании в течение 60 мин до 9,6±2,7, 11,8±1,6 и 22,25±4,2% соответственно по сравнению с контролем (рис. 1).

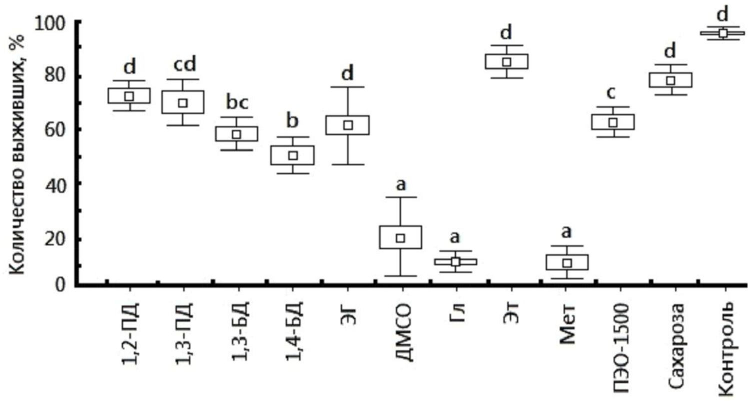



Рис. 1. Выживаемость эмбрионов лялиуса на стадии развития соответствующей биению сердца после инкубации в 10% растворах криопротекторов в течение 60 мин. Где, ± стандартное отклонение, % – среднее, ± стандартная ошибка.

Согласно нашим данным, среди проникающих криопротекторов наименьшее негативное влияние на выживаемость эмбрионов лялиуса оказали криопротекторы группы диолов (выживаемость 70–73%), Эт (выживаемость 86%) и ЭГ (выживаемость 62%), а в растворе сахарозы выживаемость составила 79%. Все значения не имеют статистически значимых различий и не отличаются от контроля.

В работе (Hagedorn M. et al., 1997) сообщалось что после инкубации эмбрионов толстолобика (Hypophthalmichthys molitrix) в 0,25М растворе сахарозы и в растворе 0,1М 1,2-ПД в течение 45 мин уровень выживаемости эмбрионов составлял 35% и 39% соответственно, который авторы расматривали как высокий. Мы предполагаем, что в нашей работе более высокий уровень выживаемости эмбрионов ляличуса на той же стадии развития, связан с меньшими размерами эмбрионов, т.к. у толстолобика оплодотворенная икра более обводнена в связи с видовыми особенностями и более подвержена осмотическому травматизму при процедурах обезвоживания (Rall W.F., 1993, Petrunkina A.M., 2007).

Тератогенность развития эмбрионов напрямую зависит от токсичности криопротектора имеющих пролонгированное влияние и способности проникать через плазматические мембраны, что специфично для каждого вида рыб (Tiersch T.R. & Mazik P.M., 2000, Gwo J.C., 2000).

Известно, что гетерогенность мембранных комплексов хориона, бластодермы и желточного синцития являются основным препятствием у эмбрионов рыб для проникновения воды и криопротекторов, но проницаемость мембран, окружающих эмбрион и желток, различна и изменяется с возрастом эмбриона (Rall W.F.,1993). В связи с этим изменяется не только уровень выживаемости эмбрионов при инкубации в криозащитных средах, но и уровень их тератогенности.

Остаточное влияние криопротекторов на аномальное развитие эмбрионов прослеженно нами в дальнейшем до стадии свободно плавающей личинки (рис. 2, 3).

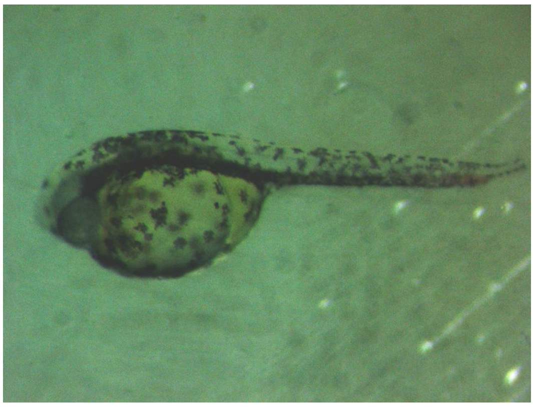


Рис. 2. Нормально развивающаяся личинка. Контроль.

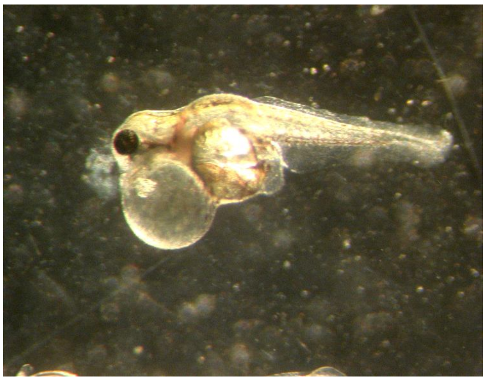
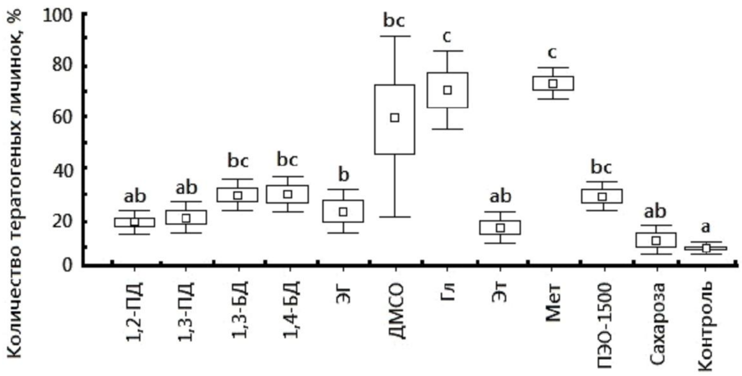


Рис. 3. Аномальное развитие личинки после инкубации в растворах криопротекторов.

В результате установлено, что растворы криопротекторов 1,2ПД, 1,3ПД, Эт, ЭГ, и раствор сахарозы в концентрации 10% обеспечивают близкую сохранность нормально развивающихся эмбрионов с минимальными потерями по отношению к контрольному уровню. Однако, в результатах эксперимента (рис. 4) показано, что криопротекторы 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО1500 и ДМСО, возможно, могут быть задействованны в составе криозащитных сред, только при условии совместного использования иных компенсаторных компонентов, что требует дальнейших исследований.




а на стадии развития соответствующей образованию 6 сомитов после инкубации в 10% растворах криопротекторов на стадии развития соответствующей 6 сомитам в течение 60 мин (от общего количества выживших). Где, ± стандартное отклонение, % – среднее, ± стандартная ошибка.

Таким образом, криопротекторы 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, Эт, ПЭО-1500, и раствор сахарозы в концентрации 10% в течение длительного времени (60 мин) не оказывают значительного влияния на уровень выживаемости эмбрионов лялиуса.

Полученные данные показывают возможность в дальнейшем использовать эти компоненты как базовые при создании и исследовании комплексных криозащитных сред в различных комбинациях.

**Выводы.** На основании представленных результатов можно сделать следующие выводы:

Растворы криопротекторов 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО 1500, Эт и раствор сахарозы в концентрации 10% обеспечивают достаточно высокий уровень выживаемости эмбрионов лялиуса и могут быть использованы в составе многокомпанентных криозащитных сред.

Растворы криопротекторов ДМСО и Мет, могут быть задействованны в составе криозащитных сред, при условии совместного использования иных компенсаторных компонентов.

**Литература**

1. Bart A.N. New approaches in cryopreservation of fish embryos / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society. 2000. P. 179-187.

2. Ding F.H., Xiao Z.Z., Li J.. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos // Theriogenology. 2007. Vol. 68, № 5. P. 702-708.

3. Gwo J.C. Cryopreservation of eggs and embryos from aquatic organisms / Cryopreservation in Aquatic Species. The World Aquaculture Society, 2000. P. 211-229.

4. Hagedorn M., Hsu E.W., Kleinhans F.Hagedorn M., Kleinhans F.W., Wildt D.E. et al. Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio* // Cryobiology.1997.Vol. 34, № 3. P. 251-263.

5. 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.

6. Isaeva A., Zhang T., Rawson D.M. Studies sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes // Cryobiology. 2004. Vol. 49, № 2. P. 114-122.

7. Liu K.C., Chou T.C., Lin H.D. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing // Aquatic Living Resources. 1993. Vol. 6, № 1. P. 63-66.

8. Petrunkina A.M. Fundamental aspects of gamete cryobiology // J. Reproduktionsmed. Endokrinol. 2007. Vol. 4, № 2. P. 78-91.

9. Rall W.F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes / W.F. Rall // Genetic conservation of salmonid fishes. – New York: Plenum Publishing Corporation, 1993. P. 137–158.

10. Richter H-J. Das buch der Labyrinth-fische / H-J. Richter. Leipzig: Verlag, 1979. 164 p.
11. Robles V., Cabrita E., Real M. et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays // Cryobiology.2003. Vol. 47, № 1. P. 30-39.
12. Tian Y.S., Chen S.L., Yan A.S. et al. Studies on vitrification method of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos // Acta Zoologica. 2003. № 49. P. 843-850.
13. Tiersch T.R., Mazik P.M. Cryopreservation in aquatic species / Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. 441 p.
14. Zhang T.T. Cryopreservation of Gametes and Embryos of Aquatic Species / Life in the Frozen State. Luton: CRC Press LLC, 2004. Vol. 1. Part 4. P. 415-436.
15. Zhang T.T., Rawson D.M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol / / Cryobiology. 1998. Vol. 37, № 1. P. 13-21.
16. Миксон К.Б. Эмбрионы лялиуса (*Colisa lalia* Hamilton-Buchanan, 1822) – модельный объект для криобиологических исследований // Світ медицини та біології. 2009. № 2, ч. 1. С. 91–96.
17. Миксон К.Б., Зинченко А.В., Боброва Е.Н. Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и эмбрионах *Misgurnus fossilis* L., 1758 // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18, № 2. С. 225.
18. Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. Выживаемость эмбрионов лялиуса (*Colisa lalia* Hamilton-Buchanan, 1822) после инкубации в криозащитных средах // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18, № 3. С. 343–347.
19. Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. Условия витрификации эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis* L., 1758) в криозащитных средах / // Проблемы криобиологии. 2009. Т. 19, № 2. С. 154–162.
20. W., Wildt D.E. New approaches for studying permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation // Cryobiology. 1997. Vol. 34, № 4. P. 335–347.

## МНОГОКРАТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ РЫБ ПОСЛЕ АКТИВАЦИИ И РЕАКТИВАЦИИ

**Миксон К.Б., Черепанов В.В.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*
E-mail: kmikson@ukr.net, cryo@online.kharkov.ua

Многие виды организмов на Земле находятся под угрозой исчезновения. В настоящее время существует опасность уменьшения численности и биологического разнообразия в результате больших изменений, связанных в основном с жизнедеятельностью человека (Janzen D.H., 1988). Поэтому необходимо проводить комплексные работы по сохранению редких, исчезающих и ценных видов рыб и водных беспозвоночных организмов. Из существующих методов сохранения генетических ресурсов наиболее эффективным считается метод криоконсервации гамет, позволяющий восстановить популяцию при создании оптимальных условий окружающей среды. Криоконсервирование гамет рыб тесно связано с современными репродуктивными технологиями, имеющими своей целью остановить или, по крайней мере, снизить сокращение биоразнообразия (Leibo S.P., Songsasen N., 2002; Leung L.K., Jamieson B.G.M., 1991).

Криоконсервирование половых клеток может повлиять на аквакультуру, позволит поддерживать большие генетические фонды, снизить влияние инбридинга, уменьшить пресс на природные популяции за счет коллекционных активов, поддержать постоянные ресурсы видов рыб (некоторые виды или генетические линии уже не существующие в природе), снизить влияние аквакультуры на дикие популяции и повысить продуктивность, минимизируя влияние отрицательных результатов человеческой деятельности, послуживших причиной экологических катастроф, эпидемий и неудачных попыток искусственного разведения.

Одним из этих методов может стать многократное использование (возможно с большим интервалом времени) одних и тех же эякулятов. Этот метод представляется эффективным в случаях, когда имеет место дефицит спермы, обусловленный малым количеством самцов. Как правило, в естественных условиях нереста сперма, выделяемая самцами, быстро теряет оплодотворяющую способность. Однако, мы предполагаем создание условий in vitro, в которых многократное использование спермы после криоконсервирования окажется возможным. Известно, что спермии пресноводных карповых начинают активно двигаться после помещения их в гипотоническую среду (активация движения), время движения которых обычно не превышает 2 мин (Гинзбург А.С., 1968). Для того, чтобы спермии могли быть повторно активированными, их необходимо предварительно поместить в изотоничные условия на 10–30 мин, а затем снова поместить в гипотоничные условия (реактивировать) (Perchec G. et al., 1995).

Мы предполагаем, что эти особенности подвижности спермиев составят основу метода многократного использования спермы. После использования спермы для оплодотворения в искусственных условиях суспензия спермиев может быть собрана и, после повышения осмотического давления среды, вновь сохранена методом криоконсервирования, как ключевого момента ее длительного хранения для последующей инсеминации (Billard R., Zhang T., 2001).

Целью исследования является изучение возможности криоконсервирования активированных и реактивированных спермиев карповых рыб (*Cypriniformes*) и определение их оплодотворяющей способности при многократном использовании в процессе замораживание–отогрев–инсеминация.

**Материалы и методы.** Общая схема экспериментов представлена на рис. 1.

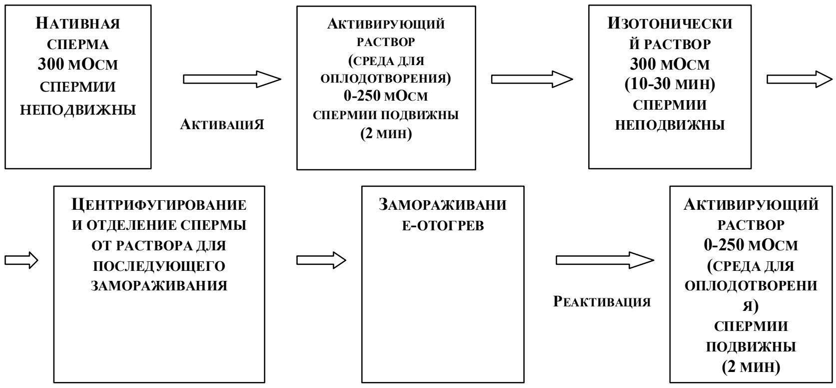



Рис. 1. Схема метода многократного использования спермы рыб.

Сперму рыб получали с помощью гипофизарных инъекций в соответствии с рыбоводными рекомендациями (Герасимов Ю.Л., 2003). Подвижность спермиев определяли методом световой микроскопии и выражали в процентах подвижных клеток видимых в поле микроскопа через 10 сек после разбавления.

Сперма до и после замораживания разбавлялась солевыми средами с различным осмотическим давлением в зависимости от постановки эксперимента. Сперму замораживали до и после активации по 3-х ступенчантой программе, используемой для криоконсервации спермы карпа (Копейка Е.Ф., 1986). Криозащитная среда (к/с) состояла из раствора ДМСО (диметилсульфоксид) в концентрации 2М.

Движение нативных спермиев активировали средами с различным осмотическим давлением. После остановки в суспензию добавляли раствор KCl с концентрацией 2М доводя осмотическое давление до 300 mOsm и определяли спермии способные к реактивации в %.

Эксперимент 1. Определение оптимальных условий реактивации спермиев карпа–кои.Объектами исследования являлась сперма карпа-кои (*Cyprinus carpio var. koi*) и белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*).

Эксперимент 2. Определение оплодотворяющей способности реактивированных спермиев толстолобика до и после разбавления криозащитной средой (к/с).

Эксперимент 3. Определение способности спермиев к реактивации после замораживания–отгрева.

Эксперимент 4. Определение криоустойчивости спермиев после активации.

Спермии после активации и их остановки помещали в изотонические условия (300 mOsm), инкубируя 30 мин, затем разбавляли к/с и охлаждали до –196 °С. После отогрева определяли количество реактивированных спермиев в %.

Нативные спермии разбавляли к/с, охлаждали до –196 °С, а после отогрева количество клеток способных к активации–реактивации в %.

Анализ результатов был проведен с помощью пакета прикладных компьютерных программ "STATISTICA". Статистически значимыми различия между сравниваемыми группами во всех случаях считали при $p<0,05$ ($n=5$). Статистически значимые различия определены между группами, которые не имеют одинаковых символов.

**Результаты.** Нами было показано, что через 20 мин инкубирования в изотонических условиях после предварительной активации наблюдалось наибольшее количество подвижных реактивированных клеток карпа–кои и белого толстолобика не имеющих статистически значимых отличий для обоих видов.

В первом эксперименте было установлено, что процентное соотношение реактивированных спермиев зависит от осмотического давления активационного и реактивационного растворов. Максимальное количество подвижных спермиев наблюдалось при использовании среды KCl с концентрацией 75 mM (рис. 2).

Во втором эксперименте было установлено, что реактивированная сперма белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) сохраняла оплодотворяющую способность (табл. 1).

В этом случае процент оплодотворения икры возрастал с повышением осмотического давления активирующего раствора. Разбавление среды криопротектором статистически не изменяло оплодотворяющую способность реактивированных спермиев.

В третьем эксперименте было показано, что имеются статистически значимые различия между реактивированными сперматозоидами в образцах спермы после разведения суспензии к/с и замороженными–отогретыми. Установлено, что при активации раствором 100 mM KCl подвижность спермиев в образцах после разбавления к/с и спермиев после процесса замораживания–отогрева была выше по сравнению со спермиями активированными раствором KCl с концентрацией 25 mM (рис. 3, 4).

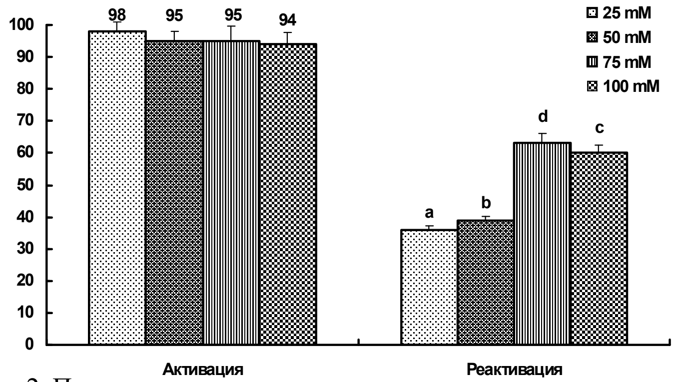



Рис. 2. Подвижность нативных спермиев карпа–кои после активации и реактивации растворами KCl с различными концентрациями, %.

Таблица 1.

Оплодотворяющая способность спермиев белого толстолобика (Hypophthalmichthys molitrix) после активации в средах с различной концентрацией NaCl и реактивированной в 25 mM NaCl.

| Концентрация NaCl в активирующем растворе, mM | Оплодотворение, % | |
|---|---|---|
| | Реактивированная свежесобранная сперма | Реактивированная сперма после разбавления к/с средой |
| 150 | $56 \pm 7^{c}$ | $59 \pm 8^{c}$ |
| 100 | $16 \pm 8^{b}$ | $22 \pm 11^{b}$ |
| 50 | $11 \pm 6^{a}$ | $13 \pm 4^{a}$ |
| 25 | 0 | 0 |

Результаты четвертого эксперимента показывают, что после процесса замораживание–отогрев с последующей активацией, общее количество подвижных спермиев было незначительным. После активации раствором KCl с концентрацией 25 mM и последующим замораживанием не более 1% сперматозоидов сохранило способность к реактивации. При этом повышение концентрации раствора до 100 mM увеличило количество подвижных сперматозоидов до 10% (рис. 5).

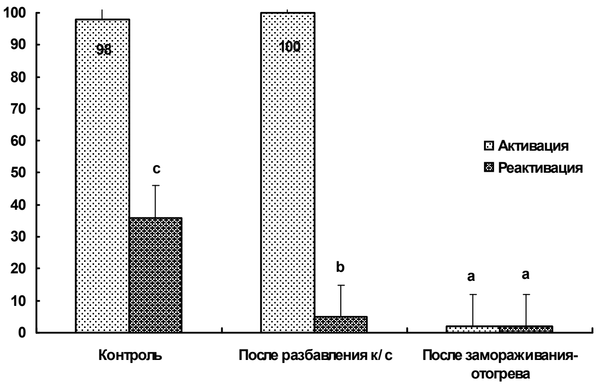



Рис. 3.Подвижность спермиев карпа–кои после активации и реактивации растворами KCl с концентрацией 25 mM до и после замораживания–отогрева, %.

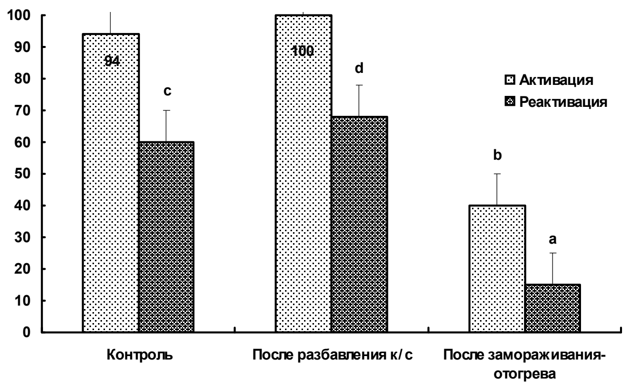



Рис. 4. Подвижность спермиев карпа–кои после активации и реактивации растворами KCl с концентрацией 100 mM до и после замораживания–отогрева, %.

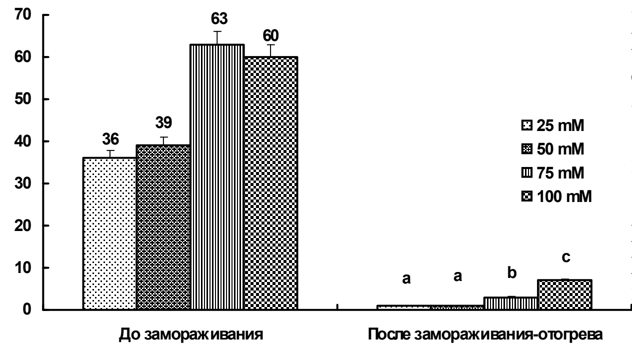



Рис. 5. Подвижность реактивированных до и после замораживания–отогрева спермиев карпа–кои активированных растворами KCl с различной концентрацией, %.

**Обсуждение.** Представленные результаты демонстрируют возможность многоступенчатой активации спермы карповых рыб. В работе показано, что сперма сохраняет довольно высокий уровень оплодотворяющей способности после ее реактивации только при использовании активирующих сред со средним уровнем гипотоничности. Этот факт, вероятно, объясняется способностью спермиев восстанавливать уровень макроэргических соединений в период инкубирования в изотонических условиях, что утрачивается после гипотонического шока, вызванного активацией гипотонической средой (ниже 100 mOsm) (Dzuba B.B. et al., 2001). Очевидно, что активация в гипотонических растворах (ниже 150 mOsm) приводит к необратимым негативным изменениям в некоторых клетках.

Криоконсервирование значительно понижает способность сперматозоидов к реактивации, оказывая влияние на подвижность сперматозоидов в процессе замораживание–отогрев. По-видимому, происходят изменения в структурах мембран (Meryman N.T., 1971), что заключается в разрушении липидных включений и перераспределении мембранных фосфолипидов (Drokin S.I., Stein H., Bartscherer H., 1998).

Однако, наши результаты свидетельствуют о возможности использования метода реактивации после процесса замораживания–отогрева, а также криоконсервирования спермиев после их активации. Мы считаем это направление достаточно перспективным, но требующим дальнейшего изучения, и надеемся объединить процедуры активации сперматозоидов и криоконсервирования для оптимизации процессов многократного использования спермы рыб и создание методологических условий.

**Выводы.** Лучшие результаты подвижности реактивированной спермы карпа–кои и белого толстолобика и сохранение их оплодотворяющей способности были достигнуты при применении растворов со средней гипотоничностью (не менее 150 mOsm), что может быть использовано в работе с нативной спермой других карповых. Несмотря на то, что криоконсервирование понижает активность сперматозоидов при реактивации, предложенный нами способ многоступенчатой схемы активации–реактивации с использованием оптимизированных криобиологических методов поможет в искуственном разведении рыб других таксономических групп. Коллекции криобанков могут быть использованы в поддержании разнообразия ресурсов аквакультуры, а также редких и исчезающих видов.

**Литература**

1. Janzen D.H. The most endangered tropical ecosystem / D.H. Janzen // Biodiversity. Washington: National Academy Press, 1988. P. 130–137.

2. Leibo S.P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species / S.P. Leibo, // Theriogenology. 2002. Vol. 57, № 1. P. 303–326.

3. Leung L.K., Jamieson B.G.M. Live preservation of fish gametes // Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge, UK: Cambbridge University Press, 1991. P. 245–269.
4. Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблемы полиспермии // М., 1968. 357 с.
5. Perchec G., et al. Relationship between sperm ATP contentand motility of carp spermatozoa // J. of Cell Science. 1995.Vol. 108. P. 747-753.
6. Billard R., Zhang T. Technique of genetic resources banking fish // Cryobanking the genetic resources: Wildlife conservation for the future. New York: Taylor and Francis, 2001. P. 143–171.
7. Герасимов Ю.Л. Основы рыбного хозяйства // Самарский университет. Самара. 2003. 108 с.
8. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа // М., ВНИИПРХ, 1986. 9 с.
9. Dzuba B.B. et al., Investigation of carp sperm cryoresistence in connection with the peculiarities in motility activation // Problems of cryobiology. 2001. № 8. P. 160.
10. Meryman N.T. Osmotic stress as a mechanismof freezing injury // Cryobiology. 1971. Vol. 8. P. 489-500.
11. Drokin S.I., Stein H., Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and brown trout (Salmo trutta f. fario) // Cryobiology.1998.Vol. 37. P. 263-270.

## СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ В КРИОБАНКЕ ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ РАН

**[1]Никишина Т. В., [2]Козлова О.Н., [3]Левицкая Г.Е., [4]Силаева Т.Б., [1]Высоцкая О.Н.**
[1] *ФГБУН ИФР РАН, г. Москва, Россия;*
E-mail: orchidcryo@mail.ru, cryostyle@rambler.ru
[2] *ГНУ ЦБС НАН, г. Минск, Беларусь;*
*E*-mail: kozlova_o@yahoo.com
*і ФГБУН ИБК РАН, г. Пущино, Россия;*
E-mail: levitskaya_g@mail.ru
[4] *ФГБОУВПО “МГУ им. Н.П. Огарёва”, г. Саранск, Мордовия;*
E-mail: tbsilaeva@yandex.ru

Ежедневно на нашей планете вымирают примерно 150–200 видов растений и животных. Вследствие этого за последние 35 лет показатели биоразнообразия дикой природы, по данным  снизились более чем на четверть. Для противодействия этому процессу в разных странах созданы генетические банки, а международным сообществом разработаны природоохранные конвенции. Известно, что наиболее экономичным методом сохранения генетических ресурсов растений является долговременное сохранение коллекций ценного растительного материала в жидком азоте, поскольку этот при криогенных температурах коллекционные образцы можно сохранять десятилетиями без существенного снижения жизнеспособности. Криобанк Института физиологии растений Российской академии наук был организован в 1982 году. В настоящее время в сотрудники ИФР РАН сохраняют многочисленные образцы коллекций редких, исчезающих и культивируемых растений в жидком азоте. Коллекция семян криобанка насчитывает более 120 видов орхидей, произрастающих в зонах умеренного и тропического климата и более 100 видов лекарственных и сельскохозяйственных растений. Кроме того, в ИФР РАН сохраняют криоколлекции 24 штаммов суспензионных культур лекарственных растений и изолированных из растений *in vitro* апексов земляники российских и зарубежных сортов. Для эффективного криосохранения растительного материала, культивируемого *in vitro*, используются разработанные и запатентованные ИФР РАН методы.

***Ключевые слова***: криосохранение, *in vitro*, коллекции растений, семена, орхидеи, земляника

## PRESERVATION OF RARE AND VALUABLE PLANTS IN IPP RAS CRYOBANK

**[1]Nikishina T. V., IKozlova O. N., iLevitskaya G. E., [4]Silaeva T. B., .№Vysotskaya O. N.**

*№IPP RAS, Moscow, Russia;*

*E*-mail: orchidcryo@mail.ru, cryostyle@rambler.ru

*I Central Botanical Garden, NAS, Minsk, Republic of Belarus;*

E-mail: kozlova_o@yahoo.com

*i Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Russia;*

E-mail: levitskaya_g@mail.ru

*[4] Ogarev Mordovia State University,Saransk, Mordovia;*

E-mail: tbsilaeva@yandex.ru

Every day around 150-200 species of plants and animals disappear on our planet and thereby biodiversity of wildlife has declined by more than a quarter in the last 35 years. To counteract this process in different countries were established the gene banks and by the international community developed environmental conventions. It is known that the most economical method of conserving plant

genetic resources is a long-term preservation of valuable collections of plant material in liquid nitrogen, since at cryogenic temperatures of collection samples may be stored for decades without significantly reducing of viability. Cryobank of Institute of Plant Physiology Russia Academy of Science was organized in 1982. Currently, IPP RAS scientists store many specimen collections of rare, endangered and cultivated plants in liquid nitrogen. Seed collection of cryobank includes more than 120 species of orchids from temperate and tropical climate and more than 100 species of medicinal and agricultural plants. In addition, collaborators of IPP RAS preserve 24 suspension cultures of medicinal plants and also meristem apices isolated from *in vitro* plants of foreign and Russian cultivars of strawberry. For effective cryopreservation of plant material cultivated in vitro were used methods developed and patented by IPP RAS scientists.

**Key words:** cryopreservation, seed, *in vitro*, plant collection, orchid, strawberry

Неотложной необходимостью для человечества в современном мире стало сохранение живых организмов, находящихся под угрозой исчезновения. За последние 35 лет, по данным фонда охраны дикой природы, показатели биоразнообразия снизились более чем на четверть. Сокращение биоразнообразия может вызвать нарушение устойчивости биосферы Земли и катастрофическую потерю её способности к саморегуляции. Ускорение процесса исчезновения видов приводит к существенному ухудшению условий для выживания на планете всех живых организмов, в том числе и человека.

Для противодействия этому процессу в конце XX века были разработаны международные конвенции для сохранения исчезающих видов живого мира планеты Земля:

• конвенция по международной торговле видами дикой флоры и фауны, находящимися под угрозой исчезновения (CITES), 1973 года;

• конвенция по сохранению мигрирующих видов диких животных (Боннская конвенция) 1979 года;

• конвенция о биологическом разнообразии (CDB), 1992 года, которая стала первым соглашением глобального характера по сохранению и использованию биологического разнообразия.

Ежегодно к конвенции CDB присоединяются новые страны и к 2010 году её подписали представители 191 государства.

Существуют два основных способа сохранения растений:

• ***in situ***: сохранение растений в их естественной среде, без перемещения, в том числе заказниках, национальных парках.

• ***ex situ*:** сохранение растений в ботанических садах и сохранение растительного материала (семена, пыльца, культуры изолированных тканей, органов и клеток) в специализированных коллекциях и криобанках.

Общеизвестно, что в сохранении нуждаются не только редкие и исчезающие виды растений, но и ценные сорта, клоны и гибриды культивируемых декоративных, лекарственных и сельскохозяйственных растений. Хранение растительного материала в жидком азоте, по сравнению с другими методами содержания коллекций, является наименее затратным. При криогенных температурах прекращаются обменные процессы, и потому нет необходимости пересаживать коллекционные образцы при долговременном хранении. На незначительной площади криобанка можно сохранять огромное количество коллекционного материала. За этот счёт можно освободить значительные площади земли, уменьшить энергетические затраты и существенно облегчить труд людей.

**1.2. Материалы и методы.** В криобанке ИФР РАН при температуре жидкого азота (-196°С) сохраняют ортодоксальные семена многих видов растений, в том числе орхидей (Никишина Т.В. и др., 2001; Никишина Т. В. и др., 2006). Для подготовки к замораживанию в жидком азоте семена из различных коллекционных образцов подсушивали на воздухе при комнатной температуре, в течение недели, а затем помещали в криоампулы (Nunc, Greiner Bio-one). Ампулы с семенами маркировали и размещали в металлической коробке, установленной в штативе для криосохранения. Расположение маркированных ампул регистрировали в специальных таблицах учётного журнала. Штатив с коробками, содержащими коллекционный материал, опускали в криохранилище с жидким азотом (ХБ-05) для долговременного хранения.

Замораживание апексов растений, культивируемых *in vitro*, выполняли по авторским методикам, разработанным сотрудниками группы криосохранения ИФР. Восстановление культуры после криогенного хранения апикальных меристем проводили *in vitro* на модифицированной агаризованной питательной среде ( *Высоцкая О.Н.* и др., 1999a; Высоцкая О.Н. и др., 1999b ). Растения - регенеранты размножали *in vitro* и переносили в полевые условия, где они цвели и плодоносили (Высоцкий В.А. и др., 2002.). Для рутинного пополнения криобанка ИФР РАН растительным материалом земляники садовой (49 сортов *Fragaria* x *ananassa* Duch.), земляники лесной (var. Reine des Vallees, *Fragaria vesca* L.) и малины красной (cv. Скромница, *Rubus idaeus* L.), размноженным *in vitro*, использовали методы, патентованные ИФР РАН (патенты РФ № 2220563, 2248121, 2302107 и др.).

Для криосохранения 24 штаммов клеток суспензионных культур растений-продуцентов лекарственных веществ использовали различные модификации метода медленного замораживания и программируемое оборудование: ЗРК-1, разработанное Харьковским институтом криобиологии и криомедицины ( Popov A.S. et all. 2006 ).

**1.3. Результаты и обсуждение.** Сохранение в жидком азоте растительного материала, образцы которого устойчивы к дегидратации, не представляет особых проблем (Pritchard H.W., 1984). Ортодоксальные семена многих видов растений, в том числе и принадлежащих к семейству *Orchidaceae*, в воздушно сухом состоянии (5-13% относительной влажности) хорошо переносят как подсушивание, так и долговременное криосохранение. Более того, даже вынужденные многократные варьирования условий хранения образцов ( жидкий азот - пары жидкого азота – жидкий азот - и т.д. ) при манипуляциях с коллекционным материалом (пополнение криобанка новым материалом или извлечение криоампул из жидкого азота), связанные с конструктивными особенностями стандартного оборудования для криогенного хранения (ящики и этажерки) не оказывали существенного влияния на всхожесть ортодоксальных семян яровой пшеницы, земляники лесной и орхидей, освобождённых от молекул свободной воды ( Никишина Т.В. и др., 2011 ). Таким образом, пополнению криобанка устойчивыми к подсушиванию образцами не существует технологических и биологических препятствий.

В криобанке ИФР РАН в режиме длительного хранения сохраняют несколько коллекций:

- коллекция семян редких и лекарственных растений, собранная В.Л. Тихоновой;
- коллекция семян редких тропических орхидей, собранная Коломейцевой Г.Л. и Антипиной В.А.;
- коллекция семян редких наземных орхидей умеренной зоны;
- коллекция семян земляники альпийской (*Fragaria vesca* L.);
- коллекция апексов сортовой земляники, изолированных из растений культивированных *in vitro;*
- коллекция штаммов суспензионных культур растений – продуцентов лекарственных веществ.

**1.3.1.** Уникальная коллекция семян, собранная и привезенная Валентиной Львовной Тихоновой из разных регионов Российской Федерации (ГБС РАН), хранится в жидком азоте с 1991 года. В коллекцию входят семена 107 дикорастущих видов растений. Многие из них занесены в Красную книгу Российской федерации, региональные Красные книги РФ и Красные книги иностранных государств (табл. 1).

Таблица 1.

Криоколлекция семян редких и лекарственных растений, собранная В.Л.Тихоновой

| № | Семейство | Кол-во видов | № | Семейство | Кол-во видов |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Alliaceae | 5 | 18 | Hypericaceae | 2 |
| 2 | Apiaceae | 5 | 19 | Iridaceae | 3 |
| 3 | Aquifoliaceae | 1 | 20 | Lamiaceae | 6 |
| 4 | Araliaceae | 1 | 21 | Liliaceae | 2 |
| 5 | Asparagaceae | 1 | 22 | Papaveraceae | 4 |
| 6 | Asteraceae | 14 | 23 | Plantaginaceae | 2 |
| 7 | Berberidaceae | 2 | 24 | Polemoniaceae | 1 |
| 8 | Brassicaceae | 3 | 25 | Polygonaceae | 1 |
| 9 | Campanulaceae | 8 | 26 | Primulaceae | 1 |
| 10 | Caryophyllacea | 7 | 27 | Punicaceae | 1 |
| 11 | Crassulaceae | 1 | 28 | Ranunculaceae | 8 |
| 12 | Dioscoreaceae | 1 | 29 | Rosaceae | 2 |
| 13 | Elaeagnaceae | 1 | 30 | Scrophulariaceae | 3 |
| 14 | Fabaceae | 9 | 31 | Solanaceae | 4 |
| 15 | Fumariaceae | 2 | 32 | Urticaceae | 1 |
| 16 | Gentianaceae | 3 | 33 | Valerianaceae | 1 |
| 17 | Hypecoaceae | 1 | | | |

**1.3.2.** Криоколлекция семян земляники (*Fragaria vesca* L.) включает в себя 4 ремонтантных сорта: Baron Solemacher, Rujana, Rugen, Alexandria. Образцы семян были приобретены через розничную сеть в фирменных упаковках.

**1.3.3.** Значительную часть криобанка ИФР РАН составляют семена редких видов тропических орхидей, произрастающих в разных точках земного шара: Северной, Центральной и Южной Америке, Индокитае, Восточной Азии, Японии, на Островах Индийского и Тихого океанов, в Африке, Мадагаскаре, Австралии и на островах Тихого и Индийского океанов. Большинство образцов семян коллекции тропических орхидей были получены и собраны от оранжерейных растений сотрудниками Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН и сохраняются в жидком азоте с 2001 года (111 видов, более 800 образцов).

Образцы семян 23 тропических видов орхидей из табл. 2 включены в I приложение CITES. Эти виды орхидей находятся на грани исчезновения или уже не встречаются в дикой природе (Чёрный список Красной книги).

Виды орхидей из табл. 3 также охраняются законом и занесены во II приложение CITES, поскольку могут оказаться под угрозой исчезновения.

Таблица 2.

Виды тропических орхидей, включенные в I приложение CITES из криоколлекции семян ИФР РАН

| № | Вид | № | Вид |
|---|---|---|---|
| 1 | *Dendrobium cruentum* Rchb.f., | 13 | *P. lawrenceanum* (Rchb. f.) Pfitz. |
| 2 | *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe | 14 | *P. malipoense* Chen & Tsi. |
| 3 | *P. argus* (Rchb.f.) Stein | 15 | *P. primulinum* Wood & Taylor |
| 4 | *P. barbatum* (Lindl.) Pfitz. | 16 | *P. purpuratum* (Lindl.) Stein |
| 5 | *P. delenatii* Guill. | 17 | *P. spicerianum* (Rchb.f.) Pfitz. |
| 6 | *P. glaucophyllum* J.J.Smith | 18 | *P. sukhakulii* Schoser & Senghas |
| 7 | *P. haynaldianum* (Rchb.f.) Stein | 19 | *P. superbiens* (Rchb.f.) Stein |
| 8 | *P. hennisianum* (M.Wood) Fowlie | 20 | *P. urbanianum* Fowlie |
| 9 | *P. hirsutissimum* (Lindl. ex Hook.) Stein | 21 | *P. villosum* (Lindl.) Stein |
| 10 | *P. hirsutissimum var. esquarolei* (Schltr.) Cribb | 22 | *Peristeria elata* Hooker |
| 11 | *P. insigne* (Wall. ex Lindl.) Pfitz. | 23 | *Phragmipedium pearcei* (Rchb.f.) Rauh & Senghas |
| 12 | *P. insigne var. sanderae* (Rchb.f.) Braem | | |

Таблица 3.

Роды тропических орхидей, включенные во II приложение CITES из криоколлекции семян ИФР РАН

| № | Род | Кол-во видов | № | Род | Кол-во видо в |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Acampe* | 1 | 21 | *Maxillaria* | 1 |
| 2 | *Aerangis* | 1 | 22 | *Miltonia* | 3 |
| 3 | *Angraecum* | 3 | 23 | *Mischobulbum* | 1 |
| 4 | *Anguloa* | 1 | 24 | *Odontoglossum* | 2 |
| 5 | *Calanthe* | 9 | 25 | *Oncidium* | 1 |
| 6 | *Cattleya* | 5 | 26 | *Paphiopedilum* | 17 |
| 7 | *Chondrorhuncha* | 1 | 27 | *Peristeria* | 1 |
| 8 | *Cleisostoma* | 1 | 28 | *Pescatorea* | 1 |
| 9 | *Coelogyne* | 2 | 29 | *Phaius* | 2 |
| 10 | *Cymbidium* | 2 | 30 | *Pholidota* | 1 |
| 11 | *Dendrobium* | 22 | 31 | *Phragmapedium* | 1 |
| 12 | *Encyclia* | 2 | 32 | *Pleyone* | 1 |
| 13 | *Epidendrum* | 2 | 33 | *Polystachya* | 1 |
| 14 | *Fliskingeria* | 1 | 34 | *Stenorhynchus* | 1 |
| 15 | *Kingidium* | 1 | 35 | *Tainia* | 1 |
| 16 | *Liparis* | 1 | 36 | *Thecopus* | 1 |
| 17 | *Ludisia* | 1 | 37 | *Thunia* | 1 |
| 18 | *Lycaste* | 1 | 38 | *Trichopilia* | 1 |
| 19 | *Malaxis* | 1 | 39 | *Vanda* | 1 |
| 20 | *Masdevallia* | 1 | 40 | *Zygopetalum* | 1 |

**1.3.4.** Последние годы криобанк ИФР РАН был пополнен видами орхидей умеренной климатической зоны (табл. 4). Благотворное сотрудничество с коллегами из различных научно-исследовательских учреждений России, Мордовии, Беларуси позволило существенно расширить коллекцию орхидей за счёт образцов семян, полученных от растений из различных регионов Российской Федерации и сопредельных государств. Отдельные виды орхидей ( *Dactylorhiza longifolia* (L. Neumann) Aver.; *D. fuchsii* (Druce ) Soo; *Epipactis helleborine* (L.)Crantz.) теперь представлены генотипами из популяций, расположенных в разных участках ареалов распространения этих видов.

Таблица 4.

Криоколлекция семян редких видов орхидей умеренной зоны северного полушария

| № | Вид | Упоминание вида в Красных книгах: | | |
|---|---|---|---|---|
| | | РФ | Беларуси и Украины | Заруб. респуб. и регионов РФ |
| 1 | *Bletilla striata striata* (Thunb.) Rchb. | — | — | — |
| 2 | *Cephalanthera longibracteata* Blume | + | — | + |
| 3 | *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch | + | + | + |
| 4 | *Cephalanthera rubra*(L.) Rich. | + | + | + |
| 5 | *Cypripedium guttatum* Sw. | — | — | + |
| 6 | *Cypripedium calceolus* L. | + | + | + |
| 7 | *Cypripedium macranthon* Sw. | + | — | + |
| 8 | *Cypripedium ventricosum*.Sw. | + | — | + |
| 9 | *Dactylorhiza longifolia* (L. Neumann) Aver. | + | — | + |
| 10 | *Dactylorhiza fuchsii* (Druce ) Soo | — | + | + |
| 11 | *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo | — | + | + |
| 12 | *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo | — | + | + |
| 13 | *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F.Hunt & Summerh. | + | + | + |
| 14 | *Dactylorhiza* ochroleuca (Wustn. ex Boll.) Holub | — | — | + |
| 15 | *Dactylorhiza praetermissa* (Druce) So? | — | — | + |
| 16 | *Dactylorhiza urvilleana* (Steud.) H. Baumann & Kunkele | + | — | + |
| 17 | *Epipactis helleborine* (L.)Crantz. | — | + | + |
| 18 | *Epipactis palustris* (L.) Crantz | — | + | + |
| 19 | *Epipactis papillosa* Franch. Et Savat. | — | — | + |
| 20 | *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br | — | + | + |
| 21 | *Liparis japonica* (Miq.)Maxim. | + | — | + |
| 22 | *Liparis loeselii* (L.) L.C. Rich. | + | + | + |
| 23 | *Listera ovata* (L.) R.BR. | — | + | + |
| 24 | *Neottia nidus-avis* (L.) Rich. | — | + | + |
| 25 | *Neottianthe cucullata* (L.)Schlechter | + | + | + |
| 26 | *Ophrys Apifera*Huds. | + | + | + |
| 27 | *Orchis militaris* L. | + | + | + |
| 28 | *Platanthera bifolia* (L.) Rich. | — | + | + |

**1.3.5.** Криосохранение растительного материала (штаммы суспензионных культур, каллусы и апикальные меристемы), который культивировали *in vitro* до замораживания в жидком азоте, требует использования специально разработанных методов. Авторский метод криосохранения меристем земляники использовали для пополнения криобанка ИФР РАН в рутинном режиме. В настоящее время криоколлекция земляники (*Fragaria L.*) насчитывает 50 мериклонов (табл. 5). После 16 лет хранения в жидком азоте восстановлена культура земляники садовой сорта Алая Зорька. Через 13 лет криосохранения восстановлены растения сорта Кокинская поздняя. Существенных отличий восстановления культуры земляники после разного срока хранения образцов изолированных апексов обнаружено не было.

Таблица 5.

Коллекция земляники (*Fragaria* L.) криобанка ИФР РАН: апексы, изолированные из растений *in vitro*

| № | Сорт отечественной селекции | № | Сорт зарубежной селекции |
|---|---|---|---|
| 1 | Алая зорька, РФ | 25 | *Ducat,* Poland, 1985 г |
| 2 | Амулет, РФ | 26 | *Elvira,* Nederlanden, 1967 г. |
| 3 | Волшебница, РФ | 27 | *Fracunda,* Deutschland, 1976 г |
| 4 | Гренада, РФ | 28 | *Florida,* USA, 1975 |
| 5 | Деданка, РФ | 29 | *Geneva,* USA, 1961 г. |
| 6 | Деснянка Кокинская, РФ | 30 | *Holiday*, USA, 1972 г |
| 7 | Дивная, РФ | 31 | *Jesco,* Deutsche Demokratische Republik, 1975 г. |
| 8 | Добрыня, РФ | 32 | *Kletter Star,* Nederlanden |
| 9 | Дочь Пурпуровой, РФ | 33 | *Marmolada,* Italy, 1995 г. |
| 10 | Жемчужница, РФ | 34 | *Mieze Schiendler*, Deutschland, 1925г. |
| 11 | Зенит, РФ | 35 | *Mount Everest*, France |
| 12 | Золушка, РФ | 36 | *Pocahontas,* USA, 1953 г. |
| 13 | Кокинская поздняя, РФ | 37 | *Profusion,* France, 1946 г |
| 14 | Кокинская ранняя, РФ | 38 | *Pandora,* United Kingdom, 1983 г |
| 15 | Красавица Загорья, РФ | 39 | *Rapella,* Nederlanden, 1983 г. |
| 16 | Кулон, РФ | 40 | *Red Gauntlet,* United Kingdom, 1957 г |
| 17 | Найдёна добрая, РФ | 41 | *Redstar,* USA, 1940 г |
| 18 | Пурпуровая, РФ | 42 | *Reine des Vallees,* France |
| 19 | Родник Дубровский, РФ | 43 | *Roxana,* Italy, 1995-1998 гг. |
| 20 | Рубиновый кулон, РФ | 44 | *Senga Sengana,* Deutschland, 1954 г |
| 21 | Северянка, РФ | 45 | *Senga Tigaja,* Deutschland, 1969 г. |
| 22 | Талка, РФ | 46 | *Sweet Heart,* Canada, 1947 г. |
| 23 | Фестивальная, РФ | 47 | *Tribute,* USA, 1981 г. |
| 24 | Ударница, РФ | 48 | *Tristar,* USA, 1981 г. |
| | | 49 | *Vola,* Nederlanden, 1961 г. |
| | | 50 | *Zephyr,* Danmark, 1965 |

**Заключение.** Криобанк ИФР РАН был основан в 1982 году. Сегодня в нем сохраняется различный растительный материал ценных штаммов и сортов культивируемых растений, а также большое количество редких видов и исчезающих видов растений. За содействие формированию коллекций криобанка сотрудники ИФР РАН благодарят коллег из:

- Нижегородского государственного университета;
- кафедры геоботаники Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;
- Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН;
- кафедры ботаники Мордовского государственного университета им. Н.П.Огарева;
- лаборатории криоконсервации генетических ресурсов Института биофизики клетки РАН;
- Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Работа по формированию коллекций семян криобанка ИФР РАН выполняется сотрудниками группы криосохранения растений отдела биологии клетки и биотехнологии и поддерживается программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа».

**Литература**

1. Popov A.S., Popova E.V., Nikishina N.V, Vysotskaya O.N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. International Journal of Refrigeration. 2006. 29. P. 403-410.
2. Pritchard H.W. Liquid Nitrogen Preservation of Terrestrial and Epiphytic Orchid Seed // Cryoletters, 1984. V. 5. P. 295-300.
3. Высоцкая О.Н., Данилова С.А., Попов А.С. Способ криосохранения in vitro меристем, изолированных из растений земляники садовой (*Fragaria L.*): Патент № 2302107 // Б.И. 2007, № 19, Т. 1. С. 166.
4. Высоцкая О.Н., Мохаммед А.И., Бутенко Р.Г. Криоконсервация меристем малины (*Rubus idaeus L.*), изолированных из растений in vitro // Известия АН РАН", сер. Биологическая, 1999. №1 С. 219-220.
5. Высоцкая О.Н., Попов А.С. Способ криосохранения меристем, изолированных из растений земляники садовой ( *Fragaria L.*) *in vitro*: Патент № 2220563 // Б.И. 2004. №1. ч. 3. С. 574.
6. Высоцкая О.Н., Попов А.С. Способ криосохранения меристем, изолированных из растений малины красной (*Rubus idaeus L.*) in vitro: Патент № 2248121 // Б.И. 2005. №8. ч. 2. С. 338.
7. Высоцкая О.Н., Попов А.С., Бутенко Р.Г. Преимущество глюкозы перед сахарозой при криосохранении меристем земляники // Физиология растений. 1999. Т. 46. №2. С. 300-302.

8. Высоцкий В.А., Карпова О.В., Высоцкая О.Н. Стабильность основных признаков у регенерантов после криосохранения // Садоводство и виноградарство". 2002. №3. С.9-12.

9. Никишина Т.В., Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Павлов В.Н., Широков А.И., Буров А.В., Попович Е.А., Попов А.С. Криосохранение семян редких российских орхидей // Доклады Академии Наук. 2006.408. Р. 136-138.

10. Никишина Т.В., Высоцкая О.Н., Соловьёва А.И., Попов А.С. Влияние температурных колебаний на жизнеспособность семян при криогенном хранении // Плодоводство и ягодоводство России. М., Изд-во: ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии, 2011. Т. XXVI. С.171-178.

11. Никишина Т.В., Попов А.С., Коломейцева Г.Л., Головкин Б.Н. Влияние криоконсервации на прорастание семян редких тропических орхидей // Физиология растений, 2001, т.48, № 6, с.930- 936.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ КАРПА

**Пуговкин А.Ю., Буцкий К. И., Копейка Е.Ф.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: antonpugovkin@mail.ru

Криоконсервирование сперматозоидов используется для сохранения генофонда рыб. Улучшение качества криоконсервированной спермы уменьшает затраты на хранение клеток, позволяет усовершенствовать биотехнику воспроизводства рыб и повышает продуктивность рыбоплеменных предприятий.

На качество спермы рыб влияет множество факторов, как на этапах формирования сперматозоидов, так и на завершающем этапе спермиации (Kopeika E. F., 2007). При искусственном осеменении для получения гамет обязательным условием является гормональная стимуляция рыб. Одним из широко используемых препаратов является гипофиз сазана. До этого времени еще недостаточно изучено действие гормональных препаратов на качество сперматозоидов рыб до и после криоконсервирования. Поэтому задачей этого исследования было изучение влияния гипофизарной гормональной стимуляции карпа на морфофункциональные характеристики нативной спермы.

**Материалы и методы.** До эксперимента и на протяжении самцы карпа содержались в рыбоводном бассейне при температуре воды 15°С. Для стимуляции сперматогенеза самцам одноразово вводили внутримышечно суспензию гипофиза из расчета 3 мг/кг массы. Сперму получали перед инъекцией и через 24 часа после гипофизарной стимуляции сперматогенеза. Во время исследования сперму хранили в закрытой посуде при температуре 16-20°С.

В качестве сред инкубации сперматозоидов использовали водные растворы NaCl различной концентрации. Концентрацию клеток определяли после разбавления в изотоническом растворе NaCl с помощью камеры Горяева. Для определения гипоосмотической устойчивости сперматозоиды инкубировали в дистиллированной воде. Инкубацию проводили при температуре 18-19°С.

Измерения проницаемости мембран для молекул воды и осмотической резистентности сперматозоидов карпа (Пуговкин А.Ю., 2013) проводили с помощью фотоэлетроколориметра KF-77 (Польша), оборудованного магнитной мешалкой и термостатированным кюветным отделением. Сперму карпа добавляли в кювету, заполненную водным раствором NaCl, погружали в кювету магнитную мешалку, быстро размешивали содержимое встряхиванием, ставили кювету в кюветное отделение и фиксировали динамику светопропускания с помощью самописца TZ 4601 «Laboratorni pristroje» (Чехия). Измерения проводили при длине волны света 610 нм. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью компьютерных программ MS Excel и Origin, различия считали статистически значимыми (*) при $p < 0,05$ ($n = 6$).

**Результаты и обсуждение.** При достаточно низкой осмотичности внеклеточной среды приток воды в клетку, вызванный значительным перепадом осмотического давления, приводит к критическому увеличению объема клетки и разрыву плазматической мембраны сперматозоида. В силу гетерогенности клеток в суспензии, повреждение всех сперматозоидов в суспензии происходит не одномоментно, а в течение характерного времени, при этом гибель клеток может быть описана распределением числа поврежденных клеток со временем.

В первом приближении кривую изменения числа клеток со временем можно получить, зная разность функций оптических плотностей $D_0(t)$ и $D(t)$ от времени. При этом, $D(t)$ – динамика оптической плотности, полученная экспериментально, учитывающая вклад как набухания, так и изменения концентрации рассеивающих частиц (рис. 1), а $D_0(t)$ – динамика оптической плотности суспензии, полученная экстраполированием $D(t)$ при $t < t_0$, где $t_0$ – время, при котором начинают повреждаться клетки, т.е. динамика, учитывающая лишь набухание клеток. Разность $D_0(t)-D(t)=\Delta D_0(t)=C(t)\varepsilon l$, т.е. пропорциональна концентрации частиц в среде, коэффициенту экстинкции и ширине кюветы. Поскольку ширина кюветы и коэффициент экстинкции являются постоянными, то $\Delta D(t)$ отражает изменение числа клеток.

Во втором приближении учитывается то, что величина изменения оптических свойств суспензии сперматозоидов зависит от концентрации клеток в кювете. Так, при $t > t_0$, с уменьшением числа неповрежденных клеток, величина изменения светопропускания или оптической плотности суспензии, получаемая экстраполированием D(t), должна уменьшаться соответственно. В результате преобразований имеем разность $D_1(t)-D(t)=\Delta D_1(t)\sim C(t)$. Нормированная кривая, отображающая динамику повреждения клеток, представлена на рис. 2. Экспериментальные значения аппроксимировали функцией вида . ($A_{1,2}$ – начальное и конечное значение $\Delta D_1(t)$, $x_0$–абсцисса центра, $dx$ –константа времени).

Осмотическую резистентность сперматозоидов оценивали по времени инкубации, при котором происходило повреждение 50% сперматозоидов исследуемой суспензии (Пуговкин А.Ю., 2013). В качестве дополнительной характеристики резистентности клеток использовали ширину дифференциальной кривой распределения сперматозоидов по устойчивости, измеренную на полувысоте и выраженную в секундах.

Как видно из табл., средняя осмотическая резистентность сперматозоидов, полученных с использованием гипофизарных инъекций и без гормональной стимуляции, значимо не различается. Это означает, что гормональная стимуляция существенно не повлияла на реакцию сперматозоидов на помещение их в гипотоничные условия, а соответственно и на их устойчивость к осмотическому шоку. При этом большая ширина распределения динамики повреждения клеток после гормональной стимуляции свидетельствует о том, что гетерогенность суспензии сперматозоидов возросла, т.е. мембраны части сперматозоидов повреждаются при меньшем времени инкубации по сравнению со спермой, полученной без гормональной стимуляции, и аналогично часть сперматозоидов выдерживает более продолжительную инкубацию. Указанный факт, предполагающий наличие в эякуляте нескольких популяций сперматозоидов, различных по устойчивости, обсуждался в работах (Redondo-Muller C., 1991). В первую очередь, он может быть объяснен разной степенью зрелости сперматозоидов.

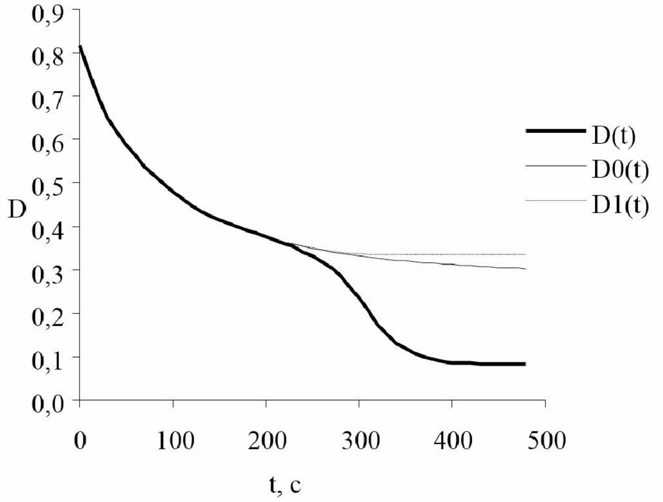



Рис. 1. Динамика оптической плотности суспензии сперматозоидов: экспериментальные значения и экстраполирование.

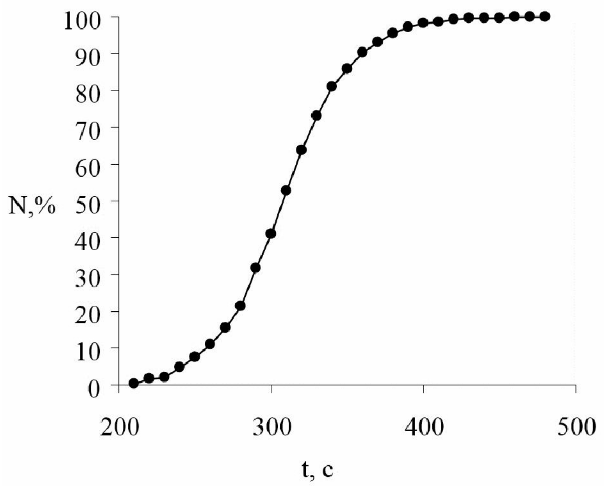



Рис. 2. Динамика повреждения сперматозоидов карпа в дистиллированной воде (интегральная кривая).

Таблица.

Характеристики спермы карпа до и после гормональной стимуляции.

| | | Сперма, полученная без гормональной стимуляции | Сперма, полученная после гормональной стимуляциии |
|---|---|---|---|
| 1 | Концентрация спермы, млрд./мл | 26,4±3,5 | 24,0±3,4 |
| 2 | Масса эякулята, г | 0,29±0,19* | 1,76±1,25* |
| 3 | Осмотическая резистентность, с | 269±28 | 273±16 |
| 4 | Ширина распределения, с | 21,4±3,5* | 26,3±4,5* |
| 5 | Время движения сперматозоидов, с | 97±18* | 68±14* |
| 6 | Масса рыб, кг | 0,96±0,20 | |

Корреляций между массой самца и количеством полученной спермы в проведенном эксперименте замечено не было. Однако в тех случаях, когда после гипофизарной инъекции был получен относительно больший объем спермы, показатели осмотической резистентности и ширины распределения были преимущественно выше по сравнению со спермой, полученной без стимуляции. Это также подтверждает предположение о содержании в сперме нескольких популяций сперматозоидов.

О различиях в свойствах спермы, полученной после гормональной стимуляции и без нее, свидетельствует разная реакция сперматозоидов на помещение их в гипотоничные среды, заключающаяся в различном характерном времени проникновения воды в клетку (рис. 3). Так, процесс проникновения молекул воды в сперматозоиды, полученные после гормональной стимуляции, длится дольше при помещении их в идентичные среды. Данный факт может объясняться повышением внутриклеточной осмотичности сперматозоидов в результате гормональной стимуляции самцов.

Гормональная стимуляция сперматогенеза, как правило, приводит к возможности получить больший объем спермы от самца (табл.). Как следует из проведенного эксперимента, гормональная стимуляция сперматогенеза не оказала существенного влияния на концентрацию клеток, однако получение больших объемов спермы в результате гормональной стимуляции часто ассоциируется с несколько меньшей концентрацией сперматозоидов за счет большего разбавления клеток полостной жидкостью.

На рис.4 представлено время движения сперматозоидов, полученных до и после гормональной стимуляции сперматогенеза. Как известно, инициация подвижности сперматозоидов карпа происходит при помещении их в гипотоничную среду. Время подвижности клеток определяли в растворах хлорида натрия осмолярностью 20, 40,…,180, 200 мОсмоль/кг и дистиллированной воде и рассчитывали среднее значение.

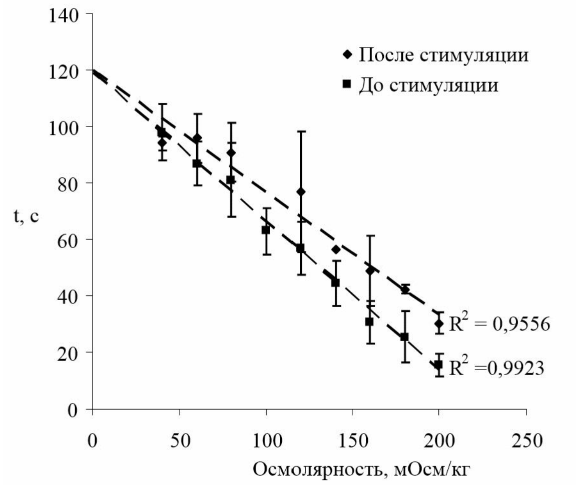



Рис. 3. Зависимость характерного времени проникновения молекул воды в сперматозоиды карпа от осмолярности внеклеточной среды

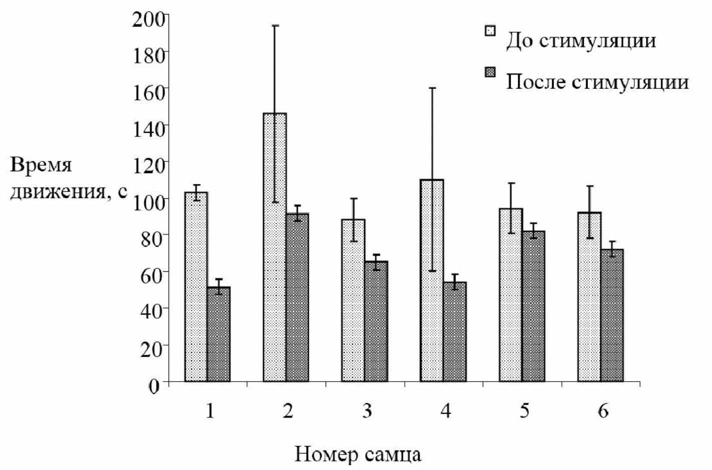



Рис. 4. Время движения сперматозоидов, полученных до и после гормональной стимуляции.

Как следует из полученных результатов, время подвижности сперматозоидов, полученных после гормональной стимуляции, ниже, чем в контроле. Как правило, наблюдается больший разброс значений времени подвижности сперматозоидов, полученных без гормональной стимуляции, т. е. сперматозоиды более чувствительны к осмотичности среды активации и в диапазоне осмолярности 100-150 мОсмоль/кг имеется максимум времени подвижности, который в зависимости от самца выражен в большей или меньшей степени (Billard R, 1995).

**Выводы.**

1. Средняя осмотическая резистентность сперматозоидов карпа, полученных до и после гипофизарной гормональной стимуляции, статистически значимо не различается.
2. После гипофизарной гормональной стимуляции гетерогенность суспензии сперматозоидов карпа выше, что выражается в наличии в сперме популяций сперматозоидов различной устойчивости.
3. Время подвижности сперматозоидов карпа, полученных после гипофизарной гормональной стимуляции, статистически значимо ниже по сравнению с контролем.

**Литература**

1. Billard R. Biology of sperm and artificial reproduction in carp // Aquaculture, 1995. Vol. 129. P. 95-112.

2. Kopeika E.F., J.E. Kopeika. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // Fish spermatology, Editors: S.H.M. Alavi, J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee. Alpha Science International Ltd. Oxford, 2007. P. 347-396.

3. Redondo-Muller C. In vitro maturation of the potential movement of carp spermatozoa // Molecular reproduction and development, 1991. Vol. 29. P. 259-270.

4. Пуговкин А. Ю. Гипоосмотическая устойчивость сперматозоидов карпа / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка // Матер. IX Междунар. научн.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2013» : тезисы докл. Севастополь: СевНТУ. 2013.

5. Пуговкин А. Ю. Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа Cyprinus carpio / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка // Матер. конф. «Холод в биологии и медицине –2013: Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии»: тезисы докл. Харьков: ИПКиК. 2013.

6. Спосіб визначення якості сперми коропа : пат. 83803 Україна : МПК G01N 33/48 G01N 15/14 /Є.Ф. Копєйка, А.Ю. Пуговкін, К.І. Буцький. № u 2013 05510 : заявл. 29.04.2013 ; опубл. 25.09.2013, Бюл. № 18.

**СОЗДАНИЕ КРИОБАНКА СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ КАК СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА СРЕДНЕРУССКИХ ПЧЕЛ**

**Сайфутдинова З.Н., Каспранов И.И., Пузанов А.С.**
*ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), Москва, Россия*
E-mail: zsaifutdin@yandex.ru

В последние годы в связи с экологическими проблемами, особую значимость приобретают методы сохранения генофонда живых организмов. Создаются заповедники, зоопарки, генофондные хозяйства, но темпы исчезновения видов пока опережают природоохранные мероприятия. Для изменения подобной тенденции необходимо значительно большее внимание уделять работам по сохранению генофонда с использованием криоконсервации. Сохранение генофонда исчезающих видов позволит в последующем при необходимости восстановить утраченные виды.

Криоконсервация спермы различных животных достаточно широко применяется в практике их разведения, воспроизводства и сохранения. Однако этого нельзя сказать в отношении такого объекта как медоносная пчела, против которой работает целая индустрия по производству пестицидов - продукции, которая убивает все что летает.

В отличие от других сельскохозяйственных животных, соотношение самцов и самок у которых примерно равное, трутней в пчелиной семье по количеству в сотни раз меньше чем самок (рабочих пчел), а к зиме их в улье не остается. Весной, когда необходимо получение ранних плодных маток не хватает половозрелых трутней: срок их развития от яйца до имаго продолжительнее на неделю по сравнению с маткой. После оплодотворения трутень погибает, т.е. их генетический материал можно использовать только один раз. Контроль оплодотворения матки невозможен, так как спаривание маток с трутнями происходит в полете на высоте свыше 10 м. За время брачного полета матка оплодотворяется примерно десятью трутнями, неизвестного происхождения. Все это осложняет проведение селекционно-генетических работ в пчеловодстве и создает настоятельную необходимость использования криоконсервации спермы трутней. К тому же в биологии развития медоносных пчел имеются видовые особенности:

Во-первых, у медоносных пчел существует естественная консервация половых гамет самцов в сперматеке матки, которая хранится там, пока она жива (матка живет примерно пять лет).

Во-вторых, в конце лета имеется большое количество биологического материала для набора спермы — это трутни, которых можно отбирать не только без ущерба для пчелиных семей, но даже с пользой, так как сохраняется энергия пчел, которая теряется ими при изгонении трутней из улья.

В-третьих, трутни развиваются из неоплодотворенных яиц, они имеют гаплоидный набор хромосом. В принципе они продуцируют сперму, которая генетически идентична генотипу их матери. При этом если в популяции появляются мутации, вредные для организма, они элиминируются благодаря гаплоидности трутней.

Таким образом, у медоносной пчелы имеются специфические особенности в биологии развития и спаривания, в связи с которыми требуется внедрение в практику метода криоконсервации спермы трутней, а также искусственного осеменения пчелиных маток, позволяющих качественно решить проблему сохранения генетических ресурсов этого вида.

Биотехнологический метод искусственного осеменения пчелиных маток в нашей стране был разработан в середине прошлого века (Михайлов А.С., 1929, Тряско В.В., 1958), однако широкого внедрения в практику этого способа получения плодных маток не произошло.

К началу 21-го века ситуация в пчеловодстве резко ухудшилась и появилась необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел. Главной причиной для этого послужило повсеместное явление, названное коллапсом пчелиных семей - КПС (colony collapse disorder - CCD), вызванное комплексом негативных экологических факторов, до конца пока невыясненных. Национальное достояние России – ценный генофонд среднерусской медоносной пчелы – также находится под угрозой исчезновения, задача ученых и практиков заключается в её сохранении. Медоносная пчела является важным элементом экосистемы, от ее деятельности зависит биоразнообразие агро- и фитоценозов (на долю пчелы приходится до 90% опыляемых энтомофильных растений) а, в конечном счете, и животного мира.

Традиционно сохранением пород и популяций пчел занимаются заповедники, заказники и племенные хозяйства. В России зарегистрированы внутрипородный тип среднерусской породы пчел Приокский (А.с. №5818 от 21.10.1992), породные типы: Орловский (патент №4110 от 23.06.2008), Татарский (патент №5476 от 28.07.2010), Бурзянская бортевая (патент №5956 от 14.06.2011) и башкирская порода (патент №3206 от 02.10.2006) (Бородачев А.В., Савушкина Л.Н., 2014). Для гарантированного сохранения необходимо закладывать сперму трутней различных пород и популяций в несколько криобанков. Дублирование закладок спермы необходимо для повышения гарантии сохранения и удобства обмена генетическим материалом.

В настоящее время ГНУ ВИЭВ имеет две уникальные коллекции (из девяти, входящих в состав Всероссийской коллекции клеточных культур – РККК, созданной в 1978 году): Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных (СХЖ) и Всероссийская специализированная коллекция постоянных линий клеток беспозвоночных (ВСКПЛК БП).

Создание ВСКПЛК БП, основателем и бессменным руководителем которой был д.б.н. В.Т. Какпаков (1937-2012), было начато еще в октябре 1967 года для сохранения и развития первой в мире линии эмбриональных клеток Drosophila melanogaster. Тогда же была отработана криобиологическая технология хранения культур клеток насекомых в жидком азоте. Впервые в России была проведена криоконсервация спермы трутней по методике, разработанной Какпаковым с соавторами, на которую получен патент (№2173045 от 10.09.2001). При искусственном (инструментальном) осеменении неплодных маток дефростированной спермой ими были получены нормальные пчелосемьи.

В 2005 году в криобанк нашего Института заложены образцы спермы трутней с пасеки Башкирской опытной станции пчеловодства и с «Царской пасеки» Измайловского парка г. Москвы. В последующие годы была заложена сперма трутней из частных пасек пчеловодов Московской области.

Набор спермы удобно проводить, так как при сжатии грудного отдела половозрелого трутня, он выворачивает эндофаллус, на конце которого находится капелька мукуса со спермой на поверхности. Отбор спермы проводится с помощью прибора в стеклянный капилляр, соединенный со шприцем (рис.).

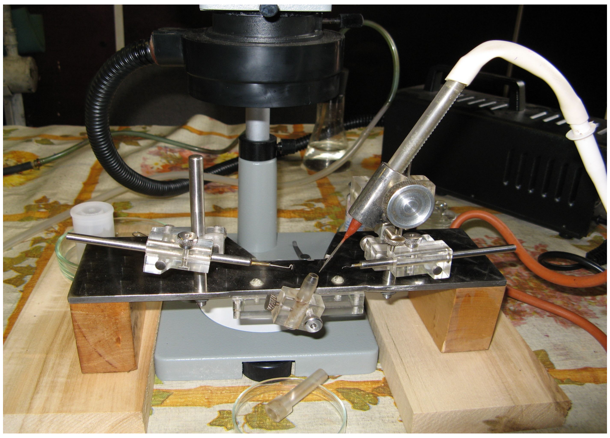


Рис. Прибор для набора спермы трутней и искусственного осеменения пчелиных маток, модернизированный шприц Тряско со стеклянным наконечником

Следующим этапом после криоконсервации спермы трутней является криоконсервация зародыщей. Известно, что сохранение эмбрионов в жидком азоте осуществляется значительно труднее по сравнению с криоконсервацией спермы, поэтому на животных она была осуществлена позднее на два с лишним десятилетия (Whittingham, 1971). Для криоконсервации зигот у медоносных пчел имеется еще одна специфическая особенность - естественный механизм «суперовуляции» самок (пчелиные матка откладывает до 2-х тысяч и более яиц в сутки) и легкость извлечения зародышей из ячеек сот. К сожалению, разработанный метод сохранения эмбрионов в жидком азоте на модельном объекте - дрозофиле, до сих пор не использован на хозяйственно-полезном виде - медоносной пчеле. Известны работы, когда положительное влияние на развитие зародышей животного, после хранения в жидком азоте, оказывало их совместное культивирование с монослоем клеток эпителия яичника (Goodeaux L. L., et al, 1989). С этой целью нами были начаты работы по получению культуры клеток из яичников маток медоносных пчел.

Таким образом, в целях сохранения генофонда и управления генетическими ресурсами среднерусской пчелы необходимо создание криобанка спермы трутней с пасек регионов России, разработка условий сбора и хранения репродуктивных клеток для дальнейшего их использования в воспроизводстве, разведении и селекционно-генетических исследованиях.

**Литература**

1. Борадачев А.В., Савушкина Л.Н. Селекционная работа со среднерусскими пчелами в России // Проблемы и перспективы сохранения генофонда медоносных пчел в современных условиях: Материалы 1-й Международ. научно-практической конференции, посвященной. 145-летию со дня рождения М.А. Дернова. Киров: НИИСХ Северо-востока, 2014. С. 38-41.

2. Михайлов А.С. Искусственное оплодотворение пчелиных маток // Опытная пасека. 1927, № 1. С. 10-22.

3. Тряско В.В. Инструментальное осеменение пчелиных маток // Пчеловодство. 1959, № 10. С. 26-33.

4. Goodeaux L. L., Voehel S.A., Anzalone C.A. et al. The effect of *Rhesus* uterine epithelial cell monolayers on in vitro growth of rhesus embryos //Ibid. 1989. V. 31. № 1. P.197.

5. Whittingham D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawning // Nature. 1971. V. 233. № 5315. P. 124-126.

# О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ РЫБ

**Цветкова Л.И., Пронина Н.Д., Докина О.Б., Рекубратский А.В., Ковалёв К.В., Парнышков В.А.**

*ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства, Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное, 141821*

E-mail: VNIPRH@mail.ru

Одним из методов, позволяющих сохранить полноценный генотип животного, является криоконсервация яйцеклеток и эмбрионов. Разработка таких методов позволила бы сделать радикальный шаг вперед в решении проблемы сохранения биоразнообразия и обеспечить значительный экономический и природоохранный эффект от их применения в аквакультуре, в сохранении адаптивного потенциала видов, в восстановлении рыбных ресурсов.

Большой вклад в создание криотехнологий для эмбрионов внесён российскими учёными (Манохина, Ананьев, 1998, 2000, 2002, 2003, 2008). На модельных объектах (данио рерио, дрозофила, крабы, карпы) изучалась криоустойчивость эмбрионов на различных этапах развития, а также влияние различных криопротекторов, сред, биологически активных добавок, предотвращающих криоповреждения при замораживании и оттаивании. Были получены единичные живые эмбрионы. К сожалению, воспроизвести успешный опыт пока не удалось. Авторы анализируют трудности, которые возникают при выполнении таких работ, и обосновывают пути создания оптимальных криотехнологий для эмбрионов рыб.

Различными группами исследователей в настоящее время определяются лишь разнообразные подходы к решению проблемы криоконсервации эмбрионов. Одна из основных задач в проблеме криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов заключается в доставке криопротекторных сред в цитоплазму и желтковые структуры, которые защищены оболочкой, становящейся особенно прочной и малопроницаемой у эмбрионов. Очевидно, что это можно сделать с помощью микроинъекций, однако продуктивность метода невелика и не позволяет обрабатывать большие партии. При заведомо низкой, даже в случае успешного замораживания-оттаивания, выживаемости подвергнутых обработке эмбрионов возможность использования метода микроинъекций для криоконсервирования эмбрионов остается неясной.

Используемые рядом авторов методы дехорионизации эмбрионов и преодоление вителлинового барьера с применением ультразвука и гипербарии пока не дали положительных результатов (Zhang et all., 1989 Chao et all., 2001, Hagedorn et all., 1997, 2000, 2002).

В этой связи перспективным подходом для доставки криопротектора через эмбриональные оболочки представляется использование электропорации, которая достигается с помощью серий электрических импульсов. Электропорация – это процесс временного повышения проницаемости мембран под действием высокоинтенсивных импульсов тока определённой формы. Электропорацию первоначально применяли в генетике для переноса ДНК и РНК через мембраны клеток про- и эукариотов, а также для трансмембранного переноса молекул разных размеров - неорганических ионов, полипептидов, ферментов, антител и различных лекарств.

При электропорации в бислойной липидной мембране возникает локальная перестройка структуры, приводящая к появлению обратимых сквозных водных каналов. Транспорт низкомолекулярных ионизированных веществ по этим каналам количественно превышает таковой при электрофорезе и ультрафонофорезе в 4 -10 раз.

Очевидно, что заключение об эффективности метода электропорации как подхода к решению проблемы криоконсервации эмбрионов можно считать положительным, если с помощью электропорации можно будет, с одной стороны, доставлять раствор криопротектора через эмбриональные оболочки и, с другой стороны, если электропорация при заданных параметрах не будет вызывать гибели эмбрионов.

В опытах была использовании оплодотворённая икра карпа. Для порации эмбрионов рыб использовалась оригинальная опытная модель электропоратора, созданная в лаборатории генетики и селекции ВНИИПРХ, позволяющая получать электрические импульсы с изменяемыми в широком диапазоне параметрами: напряжение от 12 до 60 Вольт, длительность пачки импульсов от 5 до 120 мсек, интервал между пачками от 0,5 до 5 сек, частота импульсов от 20 до 100 кГц.

Нанопоры в эмбриональных оболочках получали путём изменения напряжения, частоты и продолжительности импульсов, а также интервала между ними в пределах диапазона действия прибора. Образование микроотверстий оценивали визуально под микроскопом с использованием красителя и путём фотографирования.

Жизнеспособность эмбрионов после электропорации оценивали по проценту развивающейся икры через сутки после воздействия и выходу нормальных личинок. Для замораживания эмбрионов использовали экспериментальные криозащитные среды, содержащие в различных количествах и сочетаниях метанол, этиленгликоль, глицерин и ДМСО. Режимы замораживания и оттаивания эмбрионов были аналогичны режимам, применяемым нами при криоконсервации спермы карпа. После размораживания икру отмывали от криозащитной среды и оставляли в воде на чашках Петри для инкубации. Жизнеспособность эмбрионов после замораживания–оттаивания оценивали по целостности клеток визуально и по проценту развивающейся икры через сутки после размораживания. В качестве контроля были использованы эмбрионы, замороженные в тех же экспериментальных криозащитных средах, но без электропорации.

Были подобраны режимы электропорации, приводящие к образованию микроотверстий и не вызывающие гибель эмбрионов, для икры через 3 мин после осеменения без обесклеивания и через 60 мин после осеменения и обесклеивания в аппарате Вейса. Следует отметить, что одни и те же режимы электропорации приводили в разных опытах к несколько различным результатам, что, очевидно, связано с различиями между партиями яйцеклеток, которые были получены в разное время нерестовой кампании и от разных самок, со стадией развития и криозащитной средой, в которой проводилась порация.

По результатам трёх экспериментов на икре через 3 мин после осеменения (табл.) было установлено, что лучше всего процедуру электропорации переносят эмбрионы в криозащитных средах, содержащих ДМСО. Замораживание икры после порации во всех вариантах опыта привело к гибели клеток. Различия по сохранности оболочек эмбрионов после замораживания в опытных средах после порации не установлены. Влияние электропорации на целостность клеточных оболочек также не выявлено.

Таблица.

Выживаемость осеменённой икры в присутствии различных криопротекторов после порации без замораживания

| Номера опытов | Развитие эмбрионов после порации, % | | | |
|---|---|---|---|---|
| | вода | метанол | этиленгликоль | ДМСО |
| 1 | 16,1 | 29,3 | 16,9 | 45,2 |
| 2 | 24,8 | 35,6 | 23,4 | 41,5 |
| 3 | - | 50,5 | 42,3 | 61,3 |

Выживаемость обесклеенной икры, подвергнутой электропорации в криозащитных средах, содержащих метанол и ДМСО, через час после осеменения, оказалась на уровне 100 %. Порация той же икры в криозащитных средах с этиленгликолем и глицерином снижала выживаемость до 72,7 и 35,7 % соответственно. Эмбрионы, подвергшиеся электропорации, в результате криоконсервации погибли, однако лучшая сохранность оболочек и зародышей отмечалась также в опытных средах, содержащих метанол и ДМСО.

Результаты, полученные в опытах с оплодотворенными яйцеклетками и эмбрионами карпа, указывают на то, что электропорация позволяет растворам, содержащимся в окружающей среде, проникать через оболочки к внутренним эмбриональным структурам; электропорация не вызывает существенной гибели эмбрионов; криопротекторы ДМСО и метанол предпочтительнее использовать для замораживания эмбрионов.

Эти данные показывают возможность использования метода электропорации в исследованиях по криоконсервации эмбрионов рыб.

**Литература**

1. Chao N.H., Liao C.I. Cryopreservation of finfish and shalfish gametes and embryos // Aquaculture. 2001. 197. P. 161-189.

2. Hagedorn M., Fritz W., Kleinhans F. Problems and Prospects in Cryopreservation of Fish // Cryopreservation in Aquatic Species. Ed. Tiersch T.R., Mazik P.M. World Aquaculture Society. Advances in World Aquaculture. Baton Rouge, Louisiana, USA, 2000. V. 7. P. 161-178.

3. Hagedorn M., Hsu E., Kleinhans F., Wildt D. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation // Cryobiology. 1997. V. 34. P. 335-347.

4. Hagedorn M., Lance S.L., Fonseca D.M., Kleinhans F.W. et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an assential step towards successful cryopreservation // Biol. Repr. 2002. 67. P. 961-966.

5. Hagedorn M.E., Kleinhans F., Wildt D., Rall W.F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachidanio rerio* // Cryobiology. 1997. V. 34. P. 251-263.

6. Zhang X.S., Zhao L., Hua T.C., Zhu H.Y. A study on the cryopreservation of common carp (Cyprinus carpio) embryos // Cryo-Letters. 1989. 10. 5. P. 271-278.

7. Манохина М.С. Некоторые цитологические аспекты криорезистентности (криотолерантности) гамет и эмбрионов гидробионтов // Тр. 1 Межд. симпозиума “Генетический криобанк для аквакультуры, редких и исчезающих видов рыб и других гидробионтов”, 20-23 ноября 2000 г., Пущино.

8. Манохина М.С. Цитоэмбриологические аспекты криоустойчивости гамет и ранних зародышей // Мат-лы XV рабочего совещания “Консервация генетических ресурсов”, Пущино, 13-15 октября 1998. Пущино, 1998. С. 75-78.

9. Манохина М.С., Ананьев В.И. Криоконсервация эмбрионов и личинок гидробионтов. Проблемы и перспективы. 2008. Биофизика живой клетки. Т. 9. С. 88-89.

10. Манохина М.С., Ананьев В.И., Какпаков В.Т. Способ криоконсервации эмбрионов Brachydanio rerio // Тр. 1 Межд. симпозиума “Генетический криобанк для аквакультуры, редких и исчезающих видов рыб и других гидробионтов”, 20-23 ноября 2000 г., Пущино.

11. Манохина М.С., В.И. Ананьев. (2002) Новое в подходах к решению проблем криоконсервации эмбрионов и личинок рыб. Генетика, селекция и воспроизводство рыб. Докл. I Всероссийской коеференции (29-30 октября 2002 г., С-Петербург). С.48.

12. Манохина М.С., В.И. Ананьев. (2003) Низкотемпературная консервация эмбрионов рыб и беспозвоночных с лецитрофным типом обеспечения раннего развития (методические трудности и перспективы их преодоления). Международный симпозиум «Холодноводная аквакультура: старт в XXI век». (Россия, С-Петербург, 8-13 сентября 2003 года). С.218.

# СЕКЦИЯ IV

# ГИПОТЕРМИЯ И ЭКСТРЕМАЛЬНАЯ КРИОТЕРАПИЯ

# СУММАРНАЯ И ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ СУСЛИКОВ В ДИНАМИКЕ МЕЖБАУТНОГО ПРОБУЖДЕНИЯ

**Абдуллаев В.Р., [1]Абдуллаев Р.А.[2]**

*[1]Дагестанский государственный университет, Махачкала (Россия)*

*[21]Институт «Юждаг», Дербент (Россия)*

E-mail: vagab@mail.ru

В настоящее время умеренная искусственная гипотермия находит широкое применение в медицине с целью снижения обменных процессов, приводящих к повышению устойчивости организма к воздействию многих неблагоприятных факторов. В то же время, в природе существует большая группа животных, которые могут переносить понижение температуры тела от 37°С до 1-2°С, сохраняя при этом жизнеспособность и контроль над протеканием обмена веществ (Frink et al., 2012).

Зимняя спячка – это состояние относительно низкой метаболической активности с понижением температуры тела до $0^{o}$С, связанное с периодом низких температур и малодоступности пищи. Зимняя спячка мелких грызунов является прерывистым процессом. Через определенные промежутки времени животные пробуждаются, при этом температура тела восстанавливается до обычных значений. Именно процесс спонтанного межбаутного пробуждение является потенциально опасным в гибернаци, когда происходит резкая смена одного метаболического состояния на другое. Динамика пробуждения сопровождается реперфузией, активизацией дыхания митохондрий, в результате чего существенно активизируются процессы образования свободных радикалов в клетках (Toien et al., 2001).

Изучение спектров собственной флуоресценции мембранных белков эритроцитов крови суслика может быть одним из адекватных методов выяснения возможных конформационных изменений белково-липидного матрикса в ходе межбаутного пробуждения.

При анализе спектров флуоресценции предпочтительно применять вторые производные спектров флуоресценции (2 ПСФ) (Mozo-Villarias, 2002) как наиболее информативные Использование 2 ПСФ оправдано тем, что они, по сравнению с исходными спектрами, дают возможность получить более детальную информацию о состоянии микроокружения ароматических остатков белков, а в ряде случаев также и разделить вклад тирозиновой и триптофановой составляющих в суммарный спектр.

Интенсивность суммарной флуоресценции белков мембран эритроцитов крови сусликов с максимумом на 332 нм минимально при температуре тела 5°С и максимально при 20°С (рис. 1). Вторые производные суммарной флуоресценции белков мембран эритроцитов крови сусликов выявили несколько отрицательных пиков, основные из которых расположены на 327-332 нм (37°C, 20°C), плечи на 320, 322, 340 нм и пик на 352 нм, присутствующий на всем протяжении пробуждения (рис. 2). Вторые производные спектров триптофановой флуоресценции ($\lambda_{взб.}$= 295нм) белков мембран не претерпевают существенных изменений в ходе пробуждения, и характеризуются отрицательными пиками на 330 и 348 нм и лишь при температуре тела 25°C на спектре выявляется плечо на 338 нм (рис. 4).

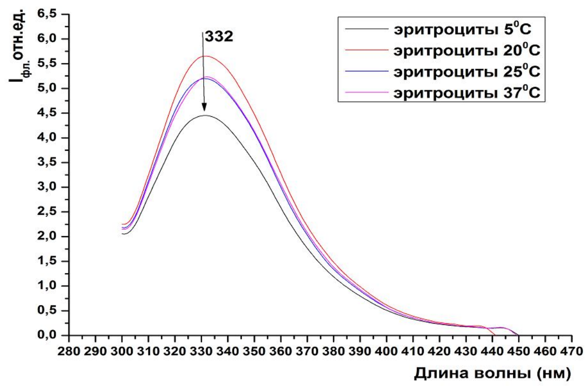



Рис. 1. Спектры флуоресценции мембран.

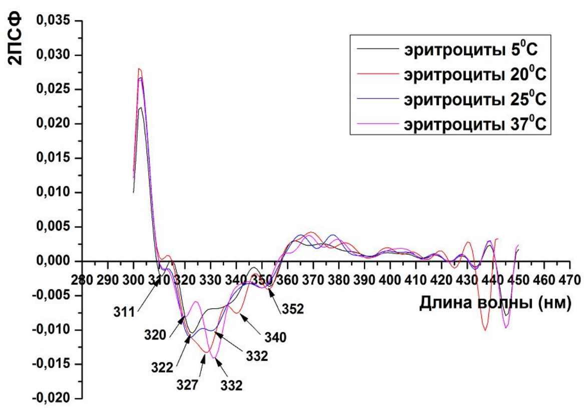



Рис. 2. Вторые производные спектров флуоресценции эритроцитов крови сусликов при $\lambda_{взб.}$= 280 нм эритроцитов крови сусликов при $\lambda_{взб.}$= 280нм.

Согласно гипотезе двух состояний, выдвинутой в работах (Конев, 1965; Burstein et al., 1973), триптофановые остатки, находящиеся в контакте с водным растворителем, характеризуются положением максимума около 330 нм, а полностью доступные водному окружению при 345–350 нм. В соответствии с этой классификацией, положение основного отрицательного максимума во 2 ПСФ может быть отнесено к триптофановым остаткам, контактирующим с водным окружением, а пик при 350 нм - к поверхностно локализованным остаткам триптофана.

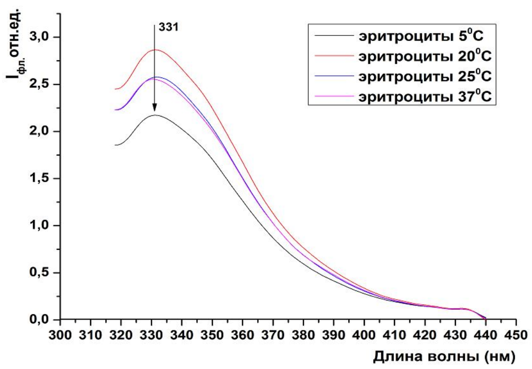



Рис. 3. Спектры флуоресценции мембран эритроцитов крови сусликов при $\lambda_{взб.}$= 295 нм

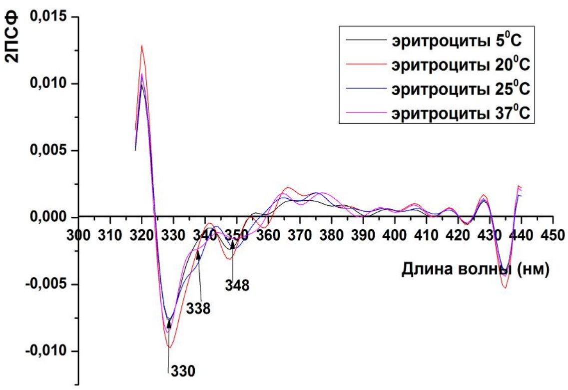



Рис. 4. Вторые производные спектров флуоресценции мембран эритроцитов крови сусликов при $\lambda_{взб.}$= 295 нм

В ходе межбаутного пробуждения сусликов в 2 ПСФ суммарной флуоресценции белков мы наблюдем существенные различия в расположении отрицательных пиков, которых нет при флуоресценции триптофанилов. Можно предположить, что основной вклад в данные различия вносят тирозиновые остатки в белках мембран эритроцитов.

**Литература**

1. Конев С. В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск: Наука и техника, 1965. 184с.
2. Toien O., Drew K.L., Chao M.L., Rice M.E. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001. V. 281. P. 572-583.
3. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // Photochem. andPhotobiol. 1973. Vol.18, №1. P. 263–279
4. Mozo-Villarias A. Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins // J. Biochem. Biophys. Methods. 2002. Vol.50, № 2-3. P. 163-178.
5. Frink M., Flohй S., van Griensven M. et al. – Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechan-isms following major challenge // Mediators Inflamm. 2012. P. 762-840.

## СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ И СЕРОТОНИНА В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА И КРОВИ КРЫС ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГЛУБОКОЙ ГИПОТЕРМИИ

**Абдуллаев Р.А.[1], Абдуллаев В.Р. [2]**

*[1]Институт «Юждаг», Дербент (Россия),*

*[2]Дагестанский государственный университет, Махачкала (Россия)*

E-mail: vagab@mail.ru

Исследуемые отделы нервной ткани существенно отличаются друг от друга по содержанию биогенных аминов. Распределение серотонина во многом совпадает с распределением в мозге катехоламинов, однако в отличие от последних значительное количество серотонина обнаружено в гипоталамической области. По сравнению с катехоламинами высокое содержание серотонина обнаружено и в плазме крови.

Охлаждение крыс до температуры тела 30-29 °С вызывает увеличение количества катехоламинов и серотонина почти во всех исследуемых отделах мозга. При этом достоверно увеличивается в больших полушариях мозга количество норадреналина (на 31 %), в мозжечке дофамина (на 40 %), адреналина (82 %), в продолговатом мозге адреналина и серотонина (в среднем на 40 %), в гипоталамусе адреналина (38 %). Содержание других исследуемых биогенных аминов в тканях мозга увеличивается в меньшей степени. В таламической области мозга количество катехоламинов и серотонина существенно не изменяется.

Таблица.

Содержание катехоламинов и серотонина в различных регионах головного мозга и крови интактных крыс (мкг на 100 г ткани мозга и на 100 мл крови; n=6-7)

| Отделы мозга и кровь | Дофамин | | Норадреналин | | Адреналин | | Серотонин | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M | ±m | M | ±m | M | ±m | M | ±m |
| Большие полушария | 37.4 | 3.2 | 45.3 | 3.2 | 28.5 | 4.7 | 42.4 | 6.1 |
| Мозжечок | 42.2 | 4.7 | 46.7 | 2.8 | 23.6 | 3.2 | 53.3 | 3.8 |
| Таламус | 52.5 | 4.1 | 48.1 | 1.8 | 34.2 | 2.9 | 57.3 | 4.8 |
| Гипоталамус | 45.6 | 4.1 | 51.4 | 4.8 | 37.3 | 2.6 | 92.2 | 5.7 |
| Продолговатый мозг | 50.4 | 5.6 | 49.3 | 5.8 | 32.1 | 3.9 | 59.5 | 2.8 |
| Кровь | - | - | 19.4 | 2.9 | 9.7 | 1.8 | 53.4 | 5.7 |

Повышенная концентрация биогенных аминов мозга, охлажденных до 30-29 °С животных, за исключением адреналина в гипоталамусе и серотонина в продолговатом мозге, при дальнейшем углублении гипотермии до 20-19 °С снижается до контрольного уровня. Однако у крыс при глубокой гипотермии в больших полушариях мозга достоверно повышается количество дофамина, адреналина, а в таламической и гипоталамической области мозга количество дофамина, адреналина и серотонина по сравнению с таковым у контрольных животных (рис. 1).

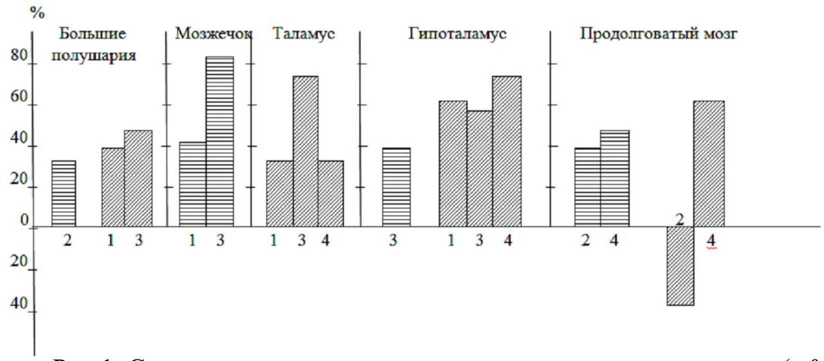



Рис.1. Сравнительное содержание катехоламинов и серотонина (в % к контролю) в отделах мозга крыс при умеренной и глубокой гипотермии. Здесь и на рис. 2:

– гипотермия 30 °С; - гипотермия 20-19 °С; - гипотермия 20 °С, пролонгированная в течение одного часа; - пролонгированная в течение двух часов; 1 – дофамин; 2 – норадреналин; 3 – адреналин; 4 – серотонин.

При 1-2-х часовой пролонгированной глубокой гипотермии содержание катехоламинов в больших полушариях мозга, мозжечке, таламусе, гипоталамусе соответствует таковому у контрольных животных. В то время количество серотонина в мозжечке, таламусе, гипоталамусе остается достоверно повышенным. В отличие от этих отделов в продолговатом мозге при этом увеличивается содержание адреналина на 50 % и снижается содержание серотонина на 34 % (рис. 2).

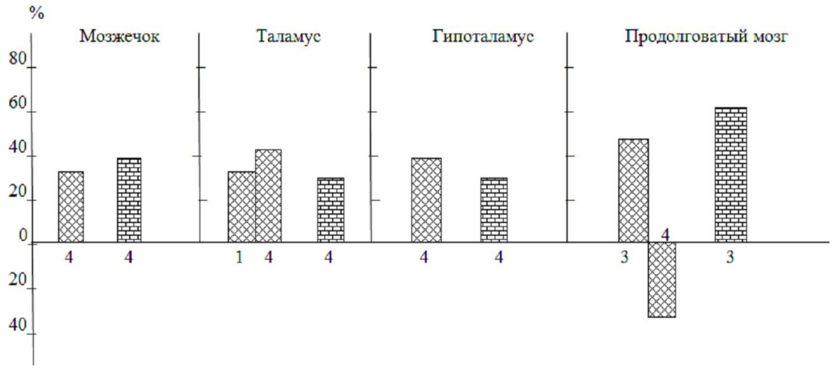



Рис. 2 - Сравнительное содержание катехоламинов и серотонина (в % к контролю) в отделах мозга крыс при пролонгированной гипотермии 20-19 °С.

Для выяснения причин изменения содержания биогенных аминов в тканях мозга охлажденных животных, а также исходя из того факта, что их содержание в спинномозговой жидкости и крови при патологических состояниях организма можно использовать как один из критериев для определения биохимического статуса центральной нервной системы, мы в параллельных опытах определяли концентрацию катехоламинов и серотонина в плазме крови. При охлаждении крыс до 30-29 °С в отличие от тканей мозга в крови увеличивается содержание норадреналина, которое остается повышенным после гипотермии и пролонгировании этого состояния в течение 1-го и 2-го часов. В то же время, содержание адреналина и серотонина достоверно повышается лишь после глубокой гипотермии и на этапах пролонгирования охлаждения снижается до контрольного уровня.

Как показывают результаты наших исследований, изменения катехоламинов и серотонина в плазме крови крыс на этапах охлаждения не соответствуют их динамике в тканях мозга что, видимо, обусловлено сохранением избирательной проницаемости ГЭБ для биогенных аминов. В связи с этим можно предположить, что уровень биогенных аминов в исследуемых отделах мозга охлажденных животных зависит от соотношения интенсивности процессов их синтеза, обратимого перехода в резервную форму и характера метаболических превращений.

Литературные данные свидетельствуют о том, что скорость синтеза катехоламинов и серотонина зависит от наличия предшественников. Экстремальные факторы, способствующие увеличению концентрации последних, стимулируют также образование биогенных аминов (Абдуллаев Р.А., Эмирбеков Э.З., 1980).

Поскольку в наших исследованиях содержание серотонина и катехоламинов повышается довольно резко, то не исключено, что в головном мозге по мере охлаждения животных снижается активность моноаминооксидазы. Снижение активности моноаминооксидазы при гипотермии может быть обусловлено как структурной модификацией фермента из-за окисления сульфгидрильных групп (Кличханов Н.К. и др., 1998), так и нарушением структуры наружной мембраны митохондрий, из-за перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов (Абдуллаев В.Р. и др., 2003; Шустанова Т.А. и др., 2003).

**Литература**

1. Абдуллаев В.Р., Кличханов Н.К., Халилов Р.А., Мейланов И.С. Перекисное окисление липидов в коре мозга крыс при гипотермии//Биология – наука XXI века. Сб.тез. 7-й Пущинской конф. Пущино, 2003. С.301.

2. Абдуллаев Р.А., Эмирбеков Э.З. Содержание свободных аминокислот в мозге при гипотермии и в разные сроки постгипотермического периода//Вопр. медю химии.1980.Т.26, С.801-807.

3. Кличханов Н.К., ХалдунАвадхУбад, Исмаилова Ж.Г. Влияние даларгина на интенсивность окислительной модификации белков крови при гипотермии//Физ.хим.основы функционирования белков и их комплексов. Воронеж. ВГУ, 1998. С.103-107.

4. Шустанова Т.А., Бондаренко Т.И., Милютина Н.П. Свободнорадикальные механизмы развития холодового стресса у крыс// Российский физиол. журн. им. Сеченова. 2004. № 1.С.73-81.

# ВЛИЯНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА И ДИМЕТИЛФОРМАМИДА НА ЭЭГ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ

**Абдурахманов Р. Г.**

*Дагестанский государственный университет,*
*г. Махачкала, Россия*
E-mail: radik72@mail.ru

Выяснение границ адаптивных возможностей различных функциональных систем организма является одной из актуальных проблем современной экспериментальной и теоретической биологии. Известно, например, что при снижении температуры тела гомойотермного животного разные в отношении филогенетического возраста структуры мозга отключаются при различных температурах[6]. Древние в филогенетическом отношении структуры обычно более устойчивы к чрезвычайным воздействиям. Эволюционные преобразования происходят таким образом, что новые приобретения сочетаются с сохранением ранних механизмов. Это означает, что филогенетически молодые структуры должны содержать в латентной форме древние механизмы адаптации. И значит, при определенных условиях(например, при гипотермии) эти древние механизмы могут включаться и в филогенетически молодые структуры. Гипотермические состояния используются в качестве нейропротекторного средства при различных гипоксических патологиях [3]. Механизмы нейропротекторного действия гипотермии не вполне ясны. В последнее время особое внимание практиков привлекает поверхностная гипотермия, при которой температура тела понижается всего на несколько градусов [4]. Несмотря на столь незначительное снижение температуры тела, потребление кислорода мозгом снижается существенно [5]

В настоящей работе предпринята попытка путем экспериментального вмешательства вызвать активацию адаптивных механизмов в мозге млекопитающих (крыс). Нами исследована электрическая активность мозга крыс при изменении температуры тела на фоне введения в организм разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола (создает дефицит АТФ в клетках), а также диметилформамида (аналог адаптогена-мочевины).

У интактных животных спонтанная электрическая активность мозга (ЭЭГ) прекращается полностью при температуре тела 17-19°С. При этом сердце еще бьется и кровообращение, видимо, на каком-то уровне сохраняется. Однако дыхание становится очень редким – примерно одно дыхательное движение в минуту против 80 дыхательных движений при 37°С. Возможно, что прекращение генерации биопотенциалов нейронами мозга происходит вследствие недостаточного снабжения мозга кислородом из-за резкого подавления дыхания при низких температурах тела. Другой причиной прекращения электрической активности мозга может быть прямое действие (подавление) низких температур на активный транспорт ионов в нейронах, в результате чего ионные насосы оказываются неспособными противостоять пассивной утечке ионов. В результате ионные градиенты могут выровняться, и генерация биопотенциалов станет невозможной.

Первое предположение можно было бы проверить, переводя животное на искусственное дыхание при низких температурах тела. Второе предположение может быть проверено с помощью веществ, создающих дефицит АТФ (топливо для ионных насосов) в клетках. В настоящей работе был использован 2,4-динитрофенол – классический разобщитель окислительного фосфорилирования.

В контроле по мере снижения температуры тела ЭЭГ закономерно изменяются – частота колебаний и их амплитуда постепенно уменьшаются и, наконец, при температуре тела около 17-18°С ЭЭГ становится практически изоэлектрической (плоской). При согревании животного после глубокой гипотермии изменения ЭЭГ претерпевают обратные изменения, но с некоторым гистерезисом.

Введение разобщителя (рис. 1) в организм животного перед охлаждением повышает температуру тела, при которой исчезает электрическая активность мозга. В среднем эта температура для ЭЭГ составляет 20,5±0,3°С. При этом ПО исчезает при 18,4±0,2°С. Это значит, при температуре 21,5°С в нейронах мозга еще сохраняются градиенты ионов, достаточные для генерации потенциалов действия. Однако для этого нужен мощный наружный стимул. Ниже 18,4°С градиенты, видимо, исчезают, так как прямое раздражение коры уже не генерирует ответ. Эти результаты указывают на то, что дефицит энергии АТФ существенно влияет на температуру, при которой исчезает функциональная активность клеток мозга.

Ранее нами было показано, что мочевина и некоторые ее аналоги снижают критическую температуру при внутрибрюшном введении [1] крысам.

Введение диметилформамида в организм животного перед охлаждением приводит к заметному снижению критической температуры, при которой прекращается электрическая активность мозга. ЭЭГ исчезает при введении диметилформамида при 15°С, ПО исчезает при 12°С (рис. 2).

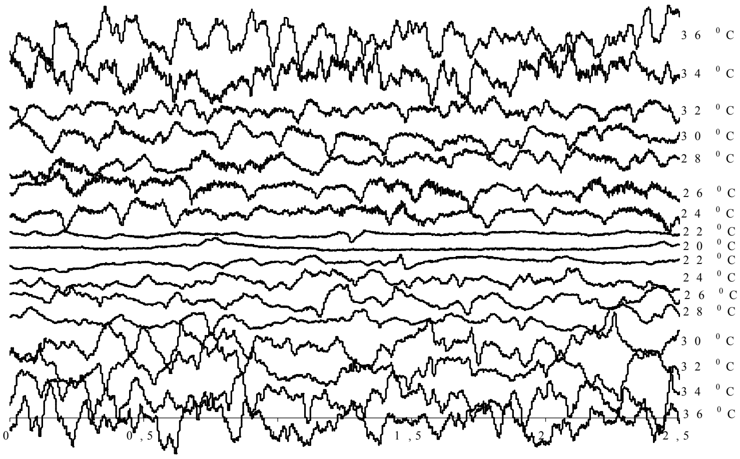



Рис. 1. ЭЭГ крысы при охлаждении и последующем согревании при введении 2,4-ДНФ в дозе 20 мг/100г живого веса тела.

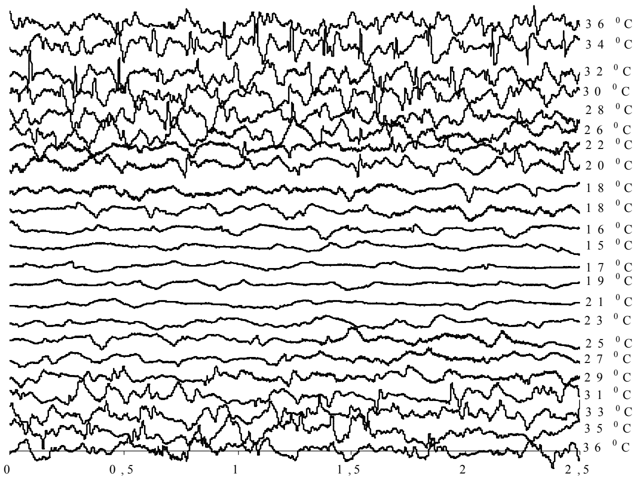



Рис.2. ЭЭГ крысы при охлаждении и последующем согревании при введении диметилформамида в дозе 3мМ/100г живого веса тела.

Этот результат указывает на то, что диметилформамид либо каким – то способом активирует процессы генерации АТФ в нейронах мозга, либо снижает пассивную проницаемость плазматической мембраны нейронов для потенциалопределяющих ионов (в первую очередь для ионов натрия). Для формулирования рабочей гипотезы в данном случае не хватает экспериментальных данных о возможном влиянии диметилформамида на ферментативные процессы в нейронах или на на пассивную проницаемость биомембран.

Другое объяснение влияние диметилформамида на критическую температуру в мозге крыс может состоять в том, что диметилформамид влияет на осмотические процессы в мозге при низкой температуре ткани. Известно, что при глубокой гипотермии может развиваться отек мозга, что подавляет электрическую активность нейронов [2]. Вещества, нормализующее осмотическое давление в клетках мозга, могут, видимо, оказывать влияние на предельно низкие температуры, при которых функционирование нейронов прекращается.

Для проверки этих гипотез необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, нами получены результаты, указывающие на возможность снижать температуру «биологического нуля» посредством введения в организм диметилформамида. Выяснение биофизических механизмов этого эффекта, возможно, расширит наши представления о механизмах адаптаций животных к экстремальным условиям.

**Литература**

1. Абдурахманов Р.Г., Мейланов И.С., Эмирбеков Э.З., Влияние мочевины, ее аналогов и сахарозы на вызванные потенциалы мозга крыс при гипотермии//Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2013. №5. С.53-56.
2. Бакай Л., Ли Д., Отек мозга. М.:Медицина.1969. С.183
3. Baron F.C., Fenerstein G.Z., White R. F., Brain Cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection //Neurosci. Biobehav. Rev.1997. V. 21. P. 31-44.
4. Busto R., Globus M.Y., Dietrich W.D., Martinez E., Valdes I., and Ginsberg M.D., Effect of mild hypothermia on ischemia –induced release in rat brain// Stroke. 1989. V. 20. P. 904-910.
5. Мак-Ильвейн Г. Биохимия и центральная нервная система. М.: Изд. иностр. литер.1962. 420 с.
6. Петров И.Р., Гублер Е.В. Искусственная гипотермия. М.: Медгиз, 1961.С. 228.

# ВЛИЯНИЕ НИФЕДИПИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ

**Абдурахманов Р.Г.**

*Дагестанский государственный университет,*
*г. Махачкала, Россия*
E-mail: radik72@mail.ru

Исследование электрической активности мозга млекопитающих при общей гипотермии имеет важное значение для выяснения механизмов работы мозга при низких температурах тела [6–9]. Электроэнцефалограмма (ЭЭГ) представляет собой результат суммации большого числа постсинаптических потенциалов большого числа нейронов [4]. В мозге существует множество различных химических синапсов, отличающихся друг от друга природой нейротрансмиттера [10]. Но выделение нейротрансмиттеров в химических синапсах в ответ на потенциал действия, поступающий в аксонную терминаль, инициируется потенциал-зависимыми кальциевыми каналами. В мозге существует много различных типов кальциевых каналов, отличающихся своими кинетическими свойствами, вольтамперной характеристикой и реакцией на изменения мембранного потенциала. В частности, в мозге существуют так называемые кальциевые каналы L-типа, которые реагируют на деполяризацию мембраны нейронов и участвуют в файринге нейронов. Эти каналы медленно инактивируются и, соответственно, пропускают большое количество ионов кальция. Специфическим блокатором кальциевых каналов L-типа является нифедипин – производное дигидропиридина. Нифедипин используется в качестве лекарства при гипертензии, и этот лечебный эффект обусловлен блокированием нифедипином кальциевых каналов L-типа. Ранее нами систематически исследовалась электрическая активность мозга крыс при гипотермии [1]. Нами было показано, что под тиопенталовым наркозом ЭЭГ крыс становится плоской при температуре тела 18-20°С. Однако если перед охлаждением ввести животному мочевину в дозе 3 мМ на 100 г веса тела, то критическая температура тела, при которой ЭЭГ становится плоской, снижается примерно до 15°С [2]. Механизм этого эффекта мочевины не известен. Некоторые структурные аналоги мочевины (например, ацетамид) также снижают критическую температуру [3]. Было предположено, что мочевина может отчасти блокировать кальциевые каналы, тем самым, предотвращая перегруз нейронов кальцием при глубокой гипотермии.

В недавно опубликованной работе было показано, что нифедипин – блокатор кальциевых каналов L-типа – при введении в организм крысы увеличивает выделение глутамата в мозге крыс. Причём оказалось, что этот эффект не связан с влиянием нифедипина на кальциевые каналы L-типа. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в головном мозге [5]. Поэтому можно было ожидать, что введение нифедипина крысам перед общим охлаждением тела снизит критическую температуру для ЭЭГ.

На рис. 1 приведены электроэнцефалограммы крыс с введением нифедипина в дозе 5мг/100г веса тела. По мере снижения температуры тела амплитуды колебаний на ЭЭГ уменьшаются.

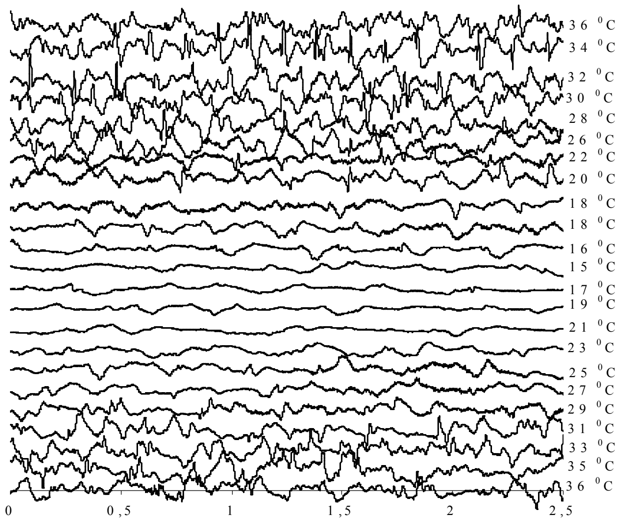



Рис. 1. ЭЭГ крысы при охлаждении и последующем согревании при введении нифедипина. Масштаб по вертикали 400 мкВ, по горизонтали – 1с. Справа указана ректальная температура.

Спектр мощности ЭЭГ закономерно изменяется (рис. 2). При температуре тела 32°C появляется полоса в области 6-7 Гц. При дальнейшем снижении температуры тела она смещается в область низких частот. При температуре тела 15°C ЭЭГ становится практически плоской. Таким образом, оправдав наши предположения о механизме действия нифедипина. При согревании животного после глубокой гипотермии ЭЭГ восстанавливается при температуре тела 21-23°C. Однако, колебания на ЭЭГ нерегулярные, амплитуда низкая. При температуре тела 36°C колебания регулярные, амплитуды колебаний примерно такие же как и до начала охлаждения. Спектр мощности ЭЭГ имеет примерно такой же вид, как и до начала охлаждения. Хотя и видно, что эти спектры отличаются друг от друга. Например, мощность колебаний в области частот от 0 до 3 Гц в начале эксперимента заметно выше, чем после согревания, хотя температура тела в обоих случаях одинакова.

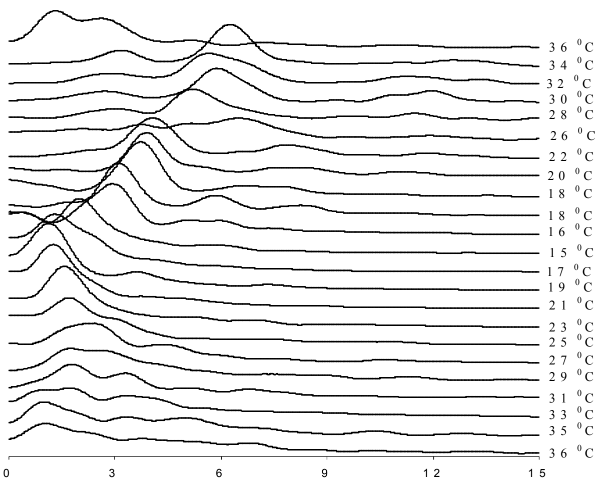



Рис.2. Спектральные плотности ЭЭГ крысы при охлаждении и последующем согревании при введении нифедипина. По оси абсцисс – частота в Гц, по оси ординат спектральная плотность в процентах от общей плотности в диапазоне от 0 до 10 гц, принятой за 100%.  Сверху вниз охлаждение и затем согревание.

Диапазон частот, в котором появляется доминирующая полоса в спектре мощности, соответствует тета-ритму. Это значит, что при поверхностной (mild) гипотермии в коре головного мозга доминирует тета-ритм. Одной из причин такой картины может быть подавление активности большого числа корковых нейронов. Известно, что несинхронизированная активность большого числа нейронов приводит к высокочастотной низкоамплитудной картине ЭЭГ. Соответственно спектр мощности будет содержать широкий набор частот. Известный эффект возникновения альфа ритма в зрительной коре при закрывании глаз объясняется именно синхронизацией активности нейронов. Но синхронизация невозможна при активности большого числа нейронов. Поскольку нейроны образуют сеть взаимосвязанных генераторов потенциалов действия. Когда сенсорная информация блокируется, импульсация в соответствующие проекции коры перестаёт поступать и большое число нейронов перестаёт генерировать потенциалы действия. Тогда становится возможной синхронизация работы «опорных нейронов», генераторов ритма. Тогда высокочастотные колебания на ЭЭГ исчезают, а ритм пейсмейкера становится доминирующим.

## Литература

1.Абдурахманов Р.Г. Влияние гипотермии на электрическую активность мозга крыс//Проблемы развития АПК региона. 2012. №1(9). С. 52-57.

2.Ахмедова С.А., Абдурахманов Р.Г., Мейланов И.С. Влияние мочевины и ее аналогов на ритмическую активность мозга крыс при гипотермии//Проблемы развития АПК региона. 2012.№2(10). С. 50-51.

3.РабадановаЗ.Г., Абдурахманов Р.Г., Мейланов И.С. Влияние ацетамида на электрическую активность мозга крыс при гипотермии// Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.2010.№5.С. 65-69

4.Жадин М.Н. Биофизические механизмы формирования электроэнцефалограммы. М.: Наука. 1984. 195с.

5. Alexej Verkhratsky, Richard K Orkand, Helmut Kettenmann. Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function//J. Physiol. Rev. 1998.V.78, No.1. P.100-130

6. Bell D. C., Butcher A. J. Berrow N.S., Page K. M. Brust P. F., Nesterova A., Stauderman K. A., Seabrook G. R., Urnberg B. N. and Dolphin A.C. Biophysical Properties, Pharmacology, and Modulation of Human, Neuronal L-Type (a1D,CaV1.3) Voltage-Dependent Calcium Currents//J Neurophysiol. 2001. V.85. P.816-827.

7.Deboer T. Brain temperature dependent changes in the electroencephalogram power spectrum of humans and animals//J. Sleep Res. 1998. V.7. P.254- 262.

8.Massopust L.C., Alsin M.S., Barnes A.W., Meder R., Kretchmer H.W. Cortical and subcortical responses to hypothermia//Exp.Neurol.1964.V.9.P.249-261.

9. Yi-ping Fan, Horn E.M., and Wadrop T. G. Biophysical Characterization of Rat Caudal Hypothalamic Neurons:Calcium Channel Contribution to Excitability //J Neurophysiol. 2000.V. 84. P.2896-2903.

10. Hirasawa M., Pittman Q.J. Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels//PNAS 2003. V.100. P.6139-6144.

## ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА НА КРИОВОЗДЕЙСТВИЕ

**Гольцев А.Н., Дябина О.А., Ямпольская Е.Е., Бондарович Н.А., Останков М.В.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail:cryopato@rambler.ru

Проведено сравнительное изучение изменений уровня экспрессии маркеров стволовых раковых клеток разных уровней дифференцировки в динамике развития аденокарциномы Эрлиха до и после воздействия факторов криоконсервирования. Отмечены различия изменений количественных и функциональных характеристик опухоль-индуцирующих предшественников в зависимости от степени их дифференцировки и времени культивирования. Установлен «ревитализирующий» эффект факторов криоконсервирования в отношении стволовых предшественников «стареющей» культуры АКЭ. Полученные данные свидетельствуют о необходимости корректного выбора сроков криоиррадикации злокачественных новообразований.

*Ключевые слова*: аденокарцинома Эрлиха, стволовые раковые клетки, средняя интенсивность флуоресценции.

Фундаментальные исследования в области онкологии свидетельствуют, что главной структурной единицей, участвующей в инициации, поддержании роста и метастазировании опухолей являются стволовые раковые клетки (СРК). Химио- и радиорезистентность СРК делает их потенциальными клетками-мишенями для факторов криовоздействия при иррадикации опухолей (Гольцев А.М. и др., 2011). Повышенный интерес клиницистов к применению криохирургического метода лечения злокачественных новообразований обусловлен не только возможностью механической деструкции опухолевого сайта, но и фиксацией в нем раковых клеток, предотвращая тем самым их миграцию. Однако при таком подходе лечения процент больных с развитием метастазов и рецидивами заболевания остается достаточно высоким. В связи с этим существует необходимость интенсификации экспериментальных исследований по оценке особенностей ответа трансформированных клеток на криовоздействие.

В настоящее время многими исследователями в качестве биологического маркера рассматривается плотность экспрессии опухолевых антигенов на поверхности определенных субпопуляций трансформированных клеток. Наибольшего внимания заслуживает CD44 маркер, экспрессируемый многими типами опухолей (Al Hajj M. et al., 2003), при этом только определенная часть этой популяции клеток характеризуется гиперэкспрессией этого маркера и идентифицируется как $CD44^{hi}$ , представляющие собой субпопуляцию недифференцированных СРК (Hermann P.C. et al., 2007). Помимо CD44 маркера, СРК различают по экспрессии CD24 молекулы, ассоциированной со степенью зрелости опухолевых клеток-предшественников. Так, клетки с фенотипом $CD44^{+}$/$CD24^{-}$ относятся к более продвинутым в дифференцировке в сравнении с $CD44^{hi}$ СРК (Ghebeh H. et al., 2013). Очевидно, что именно различия в степени экспрессии определенных маркеров СРК на разных стадиях развития опухоли и определяет их резистентность к проводимым терапевтическим мероприятиям.

В связи с этим целью данной работы было изучение особенностей экспрессии маркеров СРК $CD44^{+}/CD24^{-}$ и $CD44^{hi}$ по мере развития аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) до и после воздействия факторов криоконсервирования.

Объектом исследования были клетки АКЭ, полученные на 7-е и 14-е сутки культивирования в системе in vivo с дальнейшей аттестацией их структурно-функционального состояния до и после криоконсервирования на 7-е и 14-е сутки роста. Клетки вводили внутрибрюшинно в дозе 3*10 кл/мышь в объеме 0,3 мл и культивировали в перитонеальной полости (ПП) семимесячных самок линии BALB/c. Для оценки абсолютного количества клеток в ПП определяли объем накопленной в ней асцитической жидкости (миллилитры) с учетом концентрации ядросодержащих клеток в суспензии АКЭ, которые подсчитывали в камере Горяева.

Криоконсервирование суспензии клеток АКЭ осуществляли в пластиковых ампулах (“Nunc”, США), без применения классических криопротекторов в АЖ при следующих условиях: $1^{0}$С/мин до минус $80^{0}$С, от минус $80^{0}$С до минус $196^{0}$С со скоростью $300\text{-}400^{0}$С/мин (Гольцев А.М. и др., 2011). Образцы отогревали на водной бане при 40°С на протяжении 50с, при постоянном шутелировании ампул до исчезновения твердой фазы.

Для идентификации клеток с фенотипом $CD44^{hi}$ и $CD44^{+}/CD24^{-}$ использовали моноклональные антитела (МАТ) фирмы BD Pharmingen (США) к CD44 (коньюгированному с FITC) и CD24 (коньюгированному с PE) антигену. Иммуноглобулины тех же изотипов были использованы в качестве контроля. Определение концентрации исследуемых субпопуляций клеток в образцах АКЭ и степень экспрессии этих молекул по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) осуществляли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США) в соответствии с рекомендациями (Гольцев А.Н. и др., 2012). Учет и анализ данных осуществляли с помощью программы WinMDI 2.9.

Для итегральной оценки функционального состояния СРК учитывали пролиферативный потенциал общей популяции АКЭ, а также репликативную активность обеих субпопуляций СРК, вычисляя абсолютную кратность увеличения за весь период роста (0-14 сутки) в ПП в виде условных коэффициентов. Подсчет проводили на 7-е и 14-е сутки культивирования в 4-х группах животных: первой группе вводили нативные АКЭ-7 (нАКЭ-7); Второй группе-криоконсервированные АКЭ-7 (кАКЭ-7): Третьей группе-нативные АКЭ-14 (нАКЭ-14); Четвертой группе-криоконсервироованные АКЭ-14 (кАКЭ-14). Полученные данные обрабатывались статистически по методу Фишера в программе MS Exel.

Анализ содержания $CD44^{hi}$ и $CD44^{+}/CD24^{-}$ клеток в процессе развития АКЭ установил снижение количества СРК обеих стадий дифференцировки, тогда как СИФ снижалась лишь у $CD44^{hi}$ клеток. У более дифференцированных предшественников данный показатель (СИФ) на 14-ые сутки увеличивался более чем в 2 раза на фоне такой же кратности сокращения количества этих клеток, что подчеркивает снижение пролиферативной активности культуры нАКЭ-14 при ее перевивке животным (табл. 1).

Таблица 1.

Характеристики СРК нАКЭ-7 и нАКЭ-14

| Показатель | нАКЭ-7 | | нАКЭ-14 | |
|---|---|---|---|---|
| | Содержание, % | СИФ, усл. ед. | Содержание, % | СИФ, усл. ед. |
| $CD44^{hi}$ | 0,38 | 9110 | 0,11 | 8250 |
| $CD44^{+}/CD24^{-}$ | 4,8 | 479 | 2,68 | 1230 |

Оценка фенотипических характеристик СРК до и после криоконсервирования продемонстрировала выраженный ответ субпопуляций СРК на криовоздействие. Так, после криоконсервирования АКЭ-7 концентрация $CD44^{hi}$ клеток в 3,5 раза снижалась по сравнению с нАКЭ-7 (табл. 2), что видимо обусловлено шеддингом части рецепторов под действием факторов криоконсервирования (Goltsev A.N. et al., 2006).

Таблица 2.

Характеристики нативных и криоконсервированных СРК АКЭ-7

| Показатель | нАКЭ-7 | | кАКЭ-7 | |
|---|---|---|---|---|
| | Содержание, % | СИФ, усл. ед. | Содержание, % | СИФ, усл. ед. |
| $CD44^{hi}$ | 0,38 | 9110 | 0,11 | 8401 |
| $CD44^{+}/CD24^{-}$ | 4,8 | 479 | 7,41 | 323 |

Наряду с этим, концентрация $CD44^{+}/CD24^{-}$ СРК повышалась в 1,5 раза. Одновременно наблюдалось и изменение плотности экспрессии этих рецепторов на СРК, что выражалось в снижении СИФ для $CD44^{+}/CD24^{-}$ клеток более чем на 30%. В популяции клеток АКЭ-14 в большей степени чем в АКЭ-7 снижалось содержание $CD44^{hi}$ и повышалось содержание $CD44^{+}/CD24^{-}$ клеток (табл. 3).

Таким образом, факторы криоконсервирования с большей степенью выраженности изменяли рецепторный репертуар более дифференцированной популяции клеток, индуцируя экспрессию CD44 рецепторов на дополнительной части СРК, что ранее было продемонстрировано с другими маркерами и на других клетках (Goltsev A.N.

et al., 2009). Подтверждением этому могут быть результаты СИФ этих клеток, свидетельствующие об уменьшении интенсивности свечения $CD44^+/CD24^-$ СРК в популяции кАКЭ-14, чем в соответствующих нативных. К тому же, только в АКЭ-14 после криoнсервирования наблюдалось повышение $CD44^{hi}$ клеток с максимальным СИФ.

Таблица 3.

Характеристики нативных и криоконсервированных СРК АКЭ-14

| Показатель | нАКЭ-14 | | кАКЭ-14 | |
|---|---|---|---|---|
| | Содержание, % | СИФ, усл. ед. | Содержание, % | СИФ, усл. ед. |
| $CD44^{hi}$ | 0,11 | 8250 | 0,05 | 9629 |
| $CD44^+/CD24^-$ | 2,68 | 1230 | 17,50 | 246 |

При последующем культивировании криоконсервированных клеток аттестация функционального состояния перевиваемых клеток АКЭ показала, что несмотря на то, что количество $CD44^{hi}$ клеток в кАКЭ-14 уменьшилось, их СИФ имел наибольшее значение. При интегральной оценке криоконсервированного материала была установлена наибольшая абсолютная кратность увеличения среди всех популяций СРК (табл. 4)

Таблица 4.

Интегральная оценка функционального состояния перевиваемых клеток АКЭ

| Показатель | Абсолютная кратность увеличения количества клеток | | | |
|---|---|---|---|---|
| | АКЭ-7 | | АКЭ-14 | |
| | Нативные | Криовоздействие | Нативные | Криовоздействие |
| Абс. количество | 329,7 | 151 | 157,5 | 264 |
| $CD44^{hi}$ | 178 | 67 | 104,4 | 85 |
| $CD44^+/CD24^-$ | 135 | 97 | 43,7 | 160 |

На основании полученных результатов можно заключить, что каждая из популяций СРК индивидуально отвечает на факторы криоконсервирования. Существенным фактором, определяющим характер ответа каждой из них, является модификация структурно-функционального статуса СРК по мере развития опухолевого процесса in vivo.Под действием факторов криоконсервирования происходит селекция стволовых предшественников в зависимости от стадии развития АКЭ, чему свидетельствует более высокий репликативный потенциал самоподдержания кАКЭ-14 по сравнению с кАКЭ-7.Полученные результаты могут быть полезны в комплексном лечении злокачественных новообразований, в частности при выборе времени проведения криоманипуляций.

**Литература**

1. Гольцев А.М., Сафранчук О.В., Бондарович М.О., Челомбітько О.В., Останков М.В. Зміна кріолабільності стовбурових пухлинних клітин залежно від фази росту аденокарциноми // Фізіол. журн. 2011. Т. 57, №4.С. 68 -76.

2. Гольцев А.М., Сафранчук О.В., Бондарович М.О., Останков М.В., Бабенко Н.М., Гаєвська Ю.О., Челомбитько О.В.. Методичні підходи до стабілізації структурного і функціонального станів кріоконсервованих клітин аденокарциноми Ерліха" //Доповіді Національної академії наук України.2012. №8.С.115" 122.

3. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 2003. Vol. 100, №7. P. 3983-3989.

4. Ghebeh H., Sleiman G.M., Manogaran P.S., Al-Mazrou A., Barhoush E., Al-Mohanna F.H., Tulbah A., Al-Faqeeh K., Adra C.N. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers // BMC Cancer. 2013. Vol.14, №13. P.289.

5. Goltsev A. N., Babenko N. N., Dubrava T. G., Ostankov M. V., ShatnevaO. M. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation. // Intern. Journal of Refregeration. 2006. № 29. P. 358–367.

6. 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.

7. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // Cell Stem Cell. 2007. Vol.1. P. 313-323.

## ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА КРЫС

**Джабраилова Р.Н., Джафарова А.М., Халилов Р.А.**

*Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия*

E-mail: rfin@yandex.ru

Температура – это один из факторов окружающей среды, который играет важную роль в распределении видов и их выживании [Hochachka P.W. and Somero G.N., 2002]. Такая важность температуры обусловлена ее влиянием на скорость физиологических и химических процессов в живых системах, на стабильность биологических структур. Так как все физиологические процессы в организме сводятся к биохимическим реакциям, катализируемым ферментами, особое внимание привлекает чувствительность ферментов к изменению температуры окружающей среды [Fields P.A., et al 2002]. Изменение температуры окружающей среды требует выработки адаптивных механизмов в живых системах, способствующих сохранению функциональных свойств ферментов.

В процессе эволюции выработались две стратегии адаптации к изменению температуры окружающей среды: пойкилотермия и гомойотермия. У пойкилотермов температура тела сильно зависит от температуры окружающей среды, что связанно с несовершенством терморегуляторных механизмов. Это требует наличия у них приспособительных реакций со стороны ферментов. Эволюция пойкилотермных животных была направлена в сторону отбора животных, обладающих ферментами, изменяющимися с температурой таким образом, что активность их при этом изменялась незначительно. Это явление получило название температурной компенсации [Fields P.A., 2001].

У гомойотермов температура тела гомеостатированна в определенном диапазоне температур, что поддерживается специальными терморегуляторными механизмами. При интенсивной теплоотдаче, терморегуляторные механизмы могут не справиться со своей задачей, и температура тела может значительно снизиться. Эти состояния животного, называемые гипотермическими, очень опасны для высших позвоночных. Поэтому снижение температуры тела гомойотермного животного требует немедленной реакции со стороны организма, направленной на его выживание. Возможно, что экстремальные состояния гомойотермов включают эволюционно древние механизмы присущие пойкилотермам и находящиеся до этого в латентном состоянии. Эти механизмы могут компенсировать влияние низких температур.

Множество работ посвящено исследованию механизмов температурных компенсаций ферментов у пойкилотермных животных [Хочачка П., Сомеро Дж., 1988, 2002; Озернюк Н.Д., 2000, 2003; Fields P.A. et al 2002]. Имеются такого рода механизмы у гомойотермных животных – вопрос открытый? Ценную информацию для выяснения сложных механизмов температурных адаптаций ферментов может дать измерение их кинетических характеристик. В настоящей работе исследованы кинетические характеристики: константа Михаэлиса ($K_m$), максимальная скорость ($V_{max}$) и константа ингибирования ($K_i$ ) лактатдегидрогеназы (ключевого фермента гликолиза) мозга крыс при умеренной (30$^o$C) гипотермии.

**Материалы и методы исследования.** *Объект исследования.* Исследование проведено на белых беспородных крысах (обоих полов) массой 150-200 г. *Моделирование гипотермии.* Гипотермическое состояние создавали, помещая животных в камеру, в рубашке которой циркулировала вода с температурой 4-6 $^{o}$C. Состояние умеренной гипотермии достигалась за 25-30 минут.

*Получение тканевого экстракта*. Животных декапитировали, выделяли мозг. Навеску ткани (1-2 г) измельчали и гомогенизировали с 4-мя объёмами 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4). Гомогенат центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Центрифугат, профильтрованный через 4 слоя марли, повторно центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант хранили в холодильнике при 4°С. Активность ЛДГ в тканевом экстракте определяли по убыли содержания НАД·$H_2$ в реакционной смеси в результате энзиматического восстановления пирувата в лактат, что регистрировалось спектрофотометрически (на длине волны 340 нм в течение 2 минут). Реакционная смесь содержала 2,4 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,3 мл раствора пирувата натрия, 0,3 мл 1 мМ раствора НАД·$H_2$ и 0,05 мл тканевого экстракта, содержащего 25 мкг белка. Исследование активности ЛДГ проводили в диапазоне концентраций пирувата от 0,1 до 25,6 мМ. По результатам строили графики концентрационной зависимости. Активность ЛДГ выражали в наномолях НАДН, окисленного в результате ферментативной реакции за 1 мин на 1 мг белка (нмоль/мин•мг белка).

*Определение белка.* Содержания белка определяли по методу Лоури [Lowry D.H. et al., 1951].

*Определение кинетических характеристик.* Для определения кинетических характеристик (максимальной скорости (Vm), константы Михаэлиса (Km) и константы ингибирования Ki) по концентрационной зависимости скорости окисления НАДН методом наименьших квадратов, использовали пакет СТАТИСТИКА. В опции «нелинейное оценивание» использовали уравнение Холдейна.

**Результаты и обсуждение.** Исследование показало, что при умеренной гипотермии имеет место существенное повышение активности ЛДГ в мозге во всем диапозоне исследованных концентраций пирувата (табл. 1). Так, например, при концентрации пирувата 1,6 мМ скорость катализа увеличивается на 52,6 %.

Исследование кинетических характеристик ЛДГ мозга крыс показало, что гипотермия 30°С сопровождается значительным повышением $V_{max}$ (в 1,5 раза) (табл. 2). При этом значение $K_m$ не претерпевает изменений, поэтому в целом эффективность катализа (отношение $V_{max/}$ $K_m$) растет. Умеренная гипотермия приводит к значительному повышению $K_i$ (приблизительно в 3 раза), что свидетельствует об уменьшении скорости образования ковалентного аддукта между пируватом и ЛДГ, являющегося причиной субстратного ингибирования фермента. При этом позиция оптимума сдвигается в сторону более высоких концентраций пирувата, то есть субстратное ингибирование происходит при более высоких концентрациях пирувата.

Таблица 1.

Концентрационная зависимость активности ЛДГ (нмоль/мин·мг белка) головного мозга крыс в норме и при умеренной гипотермии.

| Состояние животного | Концентрация пирувата, мМ | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 01 | 02 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 | 6,4 | 12,8 | 25,6 |
| Контроль | 51,40± 3,429 | 86,20± 4,586 | 127,00± 13,202 | 176,00± 20,067 | 205,00± 23,893 | 208,0± 16,21 | 190,6± 14,63 | 167,20± 16,909 | 129,60± 9,249 |
| Гипотермия 30°С | 96,52± 4,76 p=0,001 | 130,2± 8,354 p=0,01 | 221,86± 4,823 p=0,01 | 274,91± 8,354 | 313,49± 21,024 | 342,4± 12,76 p=0,005 | 347,2± 8,354 p<0,005 | 318,32± 8,354 p<0,01 | 289,380 ± 9,470 p=0,001 |

Таблица 2 .

Кинетические характеристики ЛДГ головного мозга крыс в норме и при умеренной гипотермии.

| Состояние животного | $V_m\left(\frac{нмоль}{мг \cdot мин}\right)$ | $K_m(мМ)$ | $K_i$ (Мм) | $V_m / K_m (C^{-1})$ | $S_{опт}$ | ? $=K_i-K_m$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль ошибка $p_1$ | 263,23±7,054 2,6% | 0,3998±0,0299 7,5% | 23,7177 2,1994 9,2% | 658,40 | 3,07 | 23,3179 |
| Гипотермия 30°С, $p_3$ | 392,0496±10,18649 | 0,3380±0,02867 $p_{1,3}<0,05$ | 71,8127±12,33318 $p_{1,3}<0,005$ | 1159,91 | 4,92 | 71,4747 |

Таким образом, исследование показало, что при умеренной гипотермии происходит значительное повышение каталитической эффективности ЛДГ в мозге. Как известно, гипотермия 30°С сопровождается резким ухудшением кровотока в мозге и, как следствие, гипоксией. В этих условиях нейроны вынуждены выбрать энергетически менее выгодный путь окисления глюкозы - анаэробное окисление. Поэтому повышение активности ЛДГ при умеренной гипотермии направлено на интенсификацию анаэробного гликолиза, как единственного источника энергии. Смешение позиции оптимума на графике концентрационной зависимости и повышение Ki указывает на достаточно эффективный катализ при высоких (ингибирующих) концентрациях пирувата.

Обнаруженные нами изменения в кинетических характеристиках ЛДГ, скорее всего, несут адаптивный характер и направлены на поддержание ритмической активности нейронов в мозге при низких температурах тела. Исследование показало, что эффективность катализа ЛДГ изменяется в основном за счет Vmax, что указывает на увеличение либо концентрации фермента, либо константы скорости образования продуктов реакции (k2). Поскольку в условиях существенного энергодефицита вряд ли можно ожидать синтеза новых молекул фермента, скорее всего скорость увеличивается за счет k2.

Одной из возможных причин изменения k2 может быть модификация структуры фермента. При исследовании ЛДГ пойкилотермов было обнаружено, что модификация может быть вызвана фосфорилированием фермента, а также, в некоторых случаях, его ацетилированием [Storey K.B., 2012]. Обратимая адсорбция ферментов гликолиза, в числе ЛДГ, на структурных компонентах клетки также может явиться одним из важнейших механизмов регуляции его активности и скорости гликолиза в целом [Sheedy, Clarck, 2001]. Обнаружено, что взаимодействие ЛДГ с белками цитоскелета приводит к образованию комплексов, которые, изменяя равновесие в системе димер-тетрамер, влияют на каталитическую активность фермента.

Такие изменения, могут быть вызваны и изменением конформации ЛДГ, в котором могут принимать участие шапероны. Если при этом конформация должна измениться на уровне протомеров, то четвертичная структура должна быть предварительно разобрана, чтобы шапероны имели доступ к большей площади поверхности протомеров.

**Литература**

1.Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М.: 2000. 210с.

2.Озернюк Н.Д. Температурные границы жизни. М.: 2003.

3.Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988 568 с.

4.Fields P.A., Kim Y.-S., Carpenter J.F., Somero G.N. Temperature adaptation in Gillichthys (Teleost: Gobiidae) A4-lactate dehydrogenase: identical primary structures produce subtly different conformations// J. Exp. Biol. 2002. V.205. P. 1293-1303.

5.Fields P.A., Wahlstrand B.D. and Somero G.N. Intrinsic vs. extrinsic stabilization of enzymes: the interaction of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes. Eur. J. Biochem. - 2001. V. 268. P/ 4497 - 4505.

6.Hochachka P., Somero G. Biochemical adaptation // Oxford University Press. New-York. 2002.

7.Lowry D.H., Rosembrough H.J., Farr A.L. Protein measurement myth the Folinphenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265- 275.

8.Sheedy R.J., Clarck F.M. Results. Probl.Cell. Differ. 2001. 32. P. 155-164.

9.Xiong Z. J., Storey K.B. Regulation of liver lactate dehydrogenase by reversible phosphorylation in response to anoxia in a freshwater turtle // Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 2012. V. 163. P. 221 - 228.

## ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СЫВОРОТКИ КОРДОВОЙ КРОВИ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Ищенко И.О., Ковалёв Г.А., Абрафикова Л.Г.,**
**Высеканцев И.П., Сандомирский Б.П.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,*
*Харьков, Украина*
E-mail: trpr@i.ua

Заживление раны - естественный гомеостатический процесс, возникающий в ответ на повреждение и направленный на восстановление анатомической и функциональной целостности повреждённых тканей. Раны и раневая инфекция - одна из важнейших проблем клинической хирургии. Раны имеются у большинства пациентов хирургического профиля. От эффективности их лечения, зависит исход раневого процесса и время нетрудоспособности пациента.

На заживление раны, оказывают влияние степень повреждения тканей, уровень бактериальной обсемененности, вирулентность микроорганизмов и состояние кровоснабжения краёв раны. В значительной степени влияет общее состояние организма пациента. Лечение раны обязательно должно быть комплексным и учитывать фазу раневого процесса.

Несмотря на ведущую роль хирургического лечения, нельзя недооценивать значение местной и системной терапии, включающей антибактериальную терапию, детоксикацию, иммунотерапию и симптоматическое лечение. В связи с этим, перспективным подходом в лечении ран может стать применение естественных регуляторов с широким спектром биологической активности, в частности криоконсервированной сыворотки кордовой крови (КСКК).

Целью работы явилось изучение динамики микробной обсемененности и площади холодовых ран при лечении КСКК.

Работу выполняли на крысах "Сфинкс" в соответствии с требованиями комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины. Применяли криоинструмент с диаметром апликатора 8,0 мм (t= -195 С, время экспозиции - 60 сек.). Введение КСКК (экспериментальная группа) осуществляли внутримышечно, в соответствии с инструкцией для иммунно-биологического препарата "криоцелл", начиная с 3-х суток после криодеструкции. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Контроль микробной обсемененности и площади ран осуществляли на 7-е, 14-е и 21-е сутки эксперимента.

Любая рана является открытыми воротами для внедрения патогенных микроорганизмов. Наличие в ране нежизнеспособных тканей, сосудистые и прочие нарушения, вызванные травмой, способствует размножению микробной флоры, которая, в свою очередь, приводит к развитию воспаления и сопутствующего ему каскада морфо-функцинальных нарушений на местном и системном уровне. Нарушение местных иммунных процессов замедляет эрадиацию раны от патогенных микроорганизмов. Таким образом, очищение раны замедляется, что препятствует ее эпителизации.

Изучение микробной обсемененности ран показало, что у крыс контрольной группы на 7-е сутки наблюдения количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г биоптата раны составляло $5{,}7\times10^9$. У животных, получавших КСКК бактериальная обсемененность составляла $1{,}66\times10^9$ КОЕ/г, что в 3,4 раза меньше по отношению к этому показателю в контрольной группе. Площадь экспериментальных ран у не леченных животных в указанный срок наблюдения составила 137,8±19,1, а у крыс экспериментальной группы - 61,2±8,3 мм$^2$, то есть площадь ран у крыс, которым вводили КСКК, была меньше в 2,3 раза.

На 14-е сутки эксперимента микробная обсемененность ран у животных контрольной группы составляла $6{,}3\times10^7$ КОЕ/г, у крыс экспериментальной группы - $6{,}92\times10^5$ КОЕ/г. Таким образом, по сравнению с данными в контрольной группе микробная обсемененность ран на 14-е сутки эксперимента снижалась на два порядка. При этом площадь ран в контрольной и экспериментальной группах различалась в 6,1 раза и равнялась соответственно 87,1±14,2 и 14,2±1,8 мм$^2$.

Сходная динамика изучаемых показателей сохранялась и на 21-е сутки эксперимента. Микробная обсемененность ран у крыс контрольной группы составляла $1{,}95\times10^5$ КОЕ/г, площадь ран - 45,8±6,9. В то же время, у животных экспериментальной группы имела место эрадиация раневой поверхности от патогенной микрофлоры и полное закрытие дефекта молодой эпителиальной тканью.

В связи с тем, что в работе использовали животных лишенных шерстного покрова, эпителизация ран носила характер краевой. Известно, что наползание эпителия со стороны здоровой кожи возможно только на поверхность грануляционной ткани. Следовательно, результаты, полученные в экспериментальной группе подтверждают адекватное развитой грануляционной ткани и косвенно свидетельствуют об активации местных иммунных реакций.

Таким образом, системное введение КСКК приводит к значительному ускорению эрадиации от патогенной флоры и эпителизации холодовых ран. Выраженное позитивное влияние КСКК на процессы репарации ран, по-видимому, реализуется через нормализацию функционирования регуляторных систем, ответственных за процессы саногенеза на местном и системном уровне. Полученные результаты открывают перспективу изучения возможности включения КСКК в протоколы лечения ран.

Перспективным направлением дальнейших исследований может стать сравнительное изучение влияния различных биостимуляторов на динамику раневого процесса.

## ПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ ФОСФОЭТАНОЛАМИНА В МОЗГЕ ЭВРИТЕРМНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ *P. GLEHNI* ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

**Каранова М.В.**
*ФГБУН Институт биофизики клетки РАН*
*г. Пущино Московской обл., Россия*
E-mail: r_karanova@land.ru

Ярко выраженные модификации пулов свободных аминокислот в организме пойкилотермных животных в ответ на низкие температуры являются следствием усложнения и совершенствования их механизмов адаптации. Аккумуляция в большом количестве той или иной свободной аминокислоты в период сезонного снижения температуры может свидетельствовать о ее протекторной роли в низкотемпературной адаптации и радикально отличается в зависимости от этапа макроэволюции или среды обитания (Каранова, 2009; 2011; Каранова, Андреев, 2010; Каранова, Гахова, 2002; 2007).

В то же время ответы свободных аминокислот мозга пойкилотермных животных на значительные колебания температуры окружающей среды, их роль в адаптации мозга к низким температурам в условиях зимовки подо льдом или вмерзшими во льду, а также при воздействии холодовым шоком являются совершенно не изученной областью исследований. В связи с этим в качестве объекта исследования была выбрана эвритермная прудовая рыба ротан *P. glehni*, живущая в широком диапазоне температур от +25° до –1/2° С и выживающая после вмерзания в лед и последующего оттаивания (Каранова, 2009).

Ротанов отлавливали на оз. Тульчино в начале июля, в начале сентября (для экспериментов с холодовым шоком) и в первой декаде декабря.

Концентрацию свободных аминокислот в экстракте мозга определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии с последующей послеколоночной модификацией аминокислот нингидрином (Spachman et al., 1958).

Показано, что в экстракте мозга эвритермной пресноводной рыбы *P. glehni* в зимний период впервые для телеостов обнаружены нингидринположительная субстанция – фосфоэтаноламин (ФЭА), являющийся сложным эфиром фосфорной кислоты и этаноламина (табл. 1). Зимой уровень ФЭА в мозге исключительно высок (3663 ± 137 нмолей/г сырого веса, или 1/3 общего пула СА), а летом находится лишь в пределах 39 ± 15 нмоль/г. В меньшем количестве, чем ФЭА, но также впервые, выявлена и непротеиногенная фосфоаминокислота – фосфосерин (ФС), которая была обнаружена только зимой (410 ± 43 нмоль/г). Серин летом присутствовал в минимальном количестве, однако к началу зимнего периода достигал 614 ± 37 нмоль/г. Напротив, непротеиногенная сульфоаминокислота таурин, имеющая летом в мозге самый большой пул (3897 ± 166 нмоль/г), снижала к началу зимнего периода свой уровень до 905 ± 66 нмоль/г (табл. 1).

Таблица 1.

Изменения пулов свободных аминокислот и ФЭА в мозге *P. glehni* в зимний период (в нмолях/г ткани)

| Аминокислота | Июль | Декабрь |
|---|---|---|
| Фосфосерин | 0 | 410 ± 43 |
| Таурин | 3897 ± 166 | 905 ± 66 |
| ФЭА | 39 ± 15 | 3663 ± 137 |
| Аспарагиновая | 82 ± 7 | – |
| Серин | 0 | 614 ± 37 |
| Глутаминовая | 2079 ± 140 | 344 ± 22 |
| Глицин | 947 ± 53 | 669 ± 40 |
| Аланин | 896 ± 39 | 717 ± 66 |
| Тирозин | 77 ± 9 | 0 |
| ГАМК | 1105 ± 84 | 1137 ± 70* |
| Гистидин | 3290 ± 283 | 2167 ± 94 |
| Общий пул ЗСА | 12412 ± 524 | 10627 ± 226* |

*Примечание*. Общий пул ЗСА – сумма концентраций заменимых свободных аминокислот; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; среднее значение ± s.e.m; n = 4, P < 0,05 (кроме обозначенных *).

Наиболее важным событием в каскаде зимних перестроек пулов свободных аминокислот мозга эвритермной пресноводной рыбы *P. glehni*, согласно данным настоящей работы, является обнаружение на хроматограмме двух пиков – в той же области, что и в экспериментах с холодовым шоком (Каранова, 2011). В данной работе в стандартную смесь аминокислот были добавлены ФС и ФЭА, являющийся сложным эфиром фосфорной кислоты и этаноламина и также, как и аминокислоты, образующий синюю окраску с нингидрином. Сопоставлениее паттерна распределения стандартного раствора и исследуемого материала показало, что пики принадлежат именно ФЭА и ФС. Таким образом, сезонное понижение температуры (табл.1), как и воздействие холодовым шоком (табл. 2), стимулирует появление в мозге эвритермных пресноводных рыб двух новых участников, ФЭА и ФС. Появление ФЭА и ФС является специфичным именно для мозга рыб, так как в плазме крови и в экстракте мышечной ткани эти субстанции не выявляются ни в летний, ни в зимний периоды, ни при воздействии холодовым шоком (Каранова, 2009; 2011). Помимо этого, отсутствие в мозге серина летом, его высокий уровень зимой (табл. 1) и весьма значительное повышение при воздействии холодовым шоком (табл. 2) также является характерным фактом низкотемпературной адаптации именно мозга. Любопытно и многозначительно то, что все три субстанции обычно входят в связанном виде в структуру мембранных фосфолипидов и являются участниками их метаболизма (Hirabayashi, Furuya, 2008; Gibellini, Smith, 2010; Vance, Tasseva, 2013). Аккумуляция ФЭА, ФС и серина, вероятно, отражает процессы перестройки, происходящие в цитоплазматических мембранах и/или мембранах клеточных органелл.

Изменения пулов свободных аминокислот в результате воздействия холодового шока, особенно на 4-е сутки экспозиции рыб при +1°C, отражают тенденции температурной компенсации мозга (табл. 2). Эти тенденции заключаются в стремлении обеспечить стратегически важные пункты самым необходимым, чтобы максимально приблизиться к состоянию, адекватному алгоритму естественной, сезонной, адаптации к низким температурам. Происходит активная аккумуляция PEA, серина и фосфосерина, которая является нормальной для зимнего периода. В то же время происходит удаление «лишнего» таурина, как это имело место и в процессе сезонного падения температуры (табл. 1). В итоге величина пула PEA возрастает на 4-е сутки более чем в 6 раз по сравнению с контролем, но этот результат все-таки существенно ниже зимнего уровня (табл. 1). На 4-е сутки резко увеличился уровень серина, превысив в 4 раза контроль (табл. 2). Любопытно, что в этих условиях содержание серина оказалось выше даже его естественного зимнего уровня (табл. 1).

Таблица 2.

Влияние холодового шока на пулы свободных аминокислот и ФЭА в мозге *P. glehni* (в нмолях/г сырой ткани)

| Аминокислота | Контроль | После воздействия холодовым шоком |
|---|---|---|
| Фосфосерин | 0 | 172 ± 23 |
| Таурин | 2907 ±115 | 1219 ± 103 |
| ФЭА | 190 ± 21 | 1282 ± 87 |
| Аспарагиновая | 63 ± 11 | 137 ± 19 |
| Серин | 377 ± 81 | 1612 ± 118 |
| Глутаминовая | 1372 ±89 | 1787 ± 130 |
| Глицин | 422 ± 56 | 572 ± 65* |
| Аланин | 590 ± 53 | 370 ± 49 |
| Тирозин | 140 ± 15 | 46 ± 13 |
| ГАМК | 608 ± 51 | 762 ± 78* |
| Гистидин | 1344 ± 83 | 177 ± 25 |
| Общий пул ЗСА | 8013 ± 162 | 10627 ± 226 |

*Примечание* см. к табл. 1. Рыбы отловлены в начале сентября. Температура воды в условиях шока +1°С, в контроле - +12°С. Измерение проводили на 4-е сут после начала воздействия. $P < 0.05$ (кроме обозначенных *).

Таким образом, в данной работе установлены новые участники адаптивных ответов на воздействие низких температур в мозге – ФЭА и ФС, которые, вероятно, отражают активную перестройку метаболизма фосфолипидов мозга в условиях гипотермии – и в процессе сезонного понижения температуры, и в условиях острого холодового шока. Аккумуляция ФЭА и ФС в мозге телеостов при воздействии низких температур позволяет предположить их протекторную роль в низкотемпературной адаптации мозга телеостов.

**Литература**


1. Gibellini F., Smith T. Inter. Union of Biochem. Mol. Biol. 2010. V. 62. P. 414–428.
2. Hirabayashi Y., Furuya S. Prog. Lipid Res. 2008. V. 47. № 3. P. 188–203.
3. Spachman, D. H., Stein, W. H., Moore S. Anal. Chem. 1958. V. 30, № 7. P. 1190–1206.
4. Vance J., Tasseva G. BBA. 2013. V. 1831. № 3. P. 543-554.
5. Каранова М. В. Ж. Эвол. Биох. Физиол. 2009. Т. 45, № 1. С. 59–67.

6. Каранова М. В., Андреев, А. А. Ж. Эвол. Биох. Физиол. 2010. Т. 46, № 4. С. 279–283.
7. Каранова М.В., Гахова Э.Н. Биофизика. 2002. Т. 47. № 1. С. 116–124.
8. Каранова, М. В. Изв. РАН. Серия биологич. 2011. Т. 2, С. 1–9.
9. Каранова, М. В., Гахова, Э. Н. Ж. Эвол. Биох. Физиол. 2007. Т. 43, № 3. С. 258–264.

## ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ С ГЛУБОКИМИ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯМИ КОНЕЧНОСТЕЙ

**Кардовский А.Г., Тарасова Л.Н., Зайцева Г.А., Ивашкина Е.П., Ворожцова С.И., Платнова Г.К., Коваленко Д.М.**
ФГБУН "Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России"
610027 г.Киров, ул. Красноармейская, д. 72

Лечение пострадавших с криоповреждением конечностей не теряет актуальности до настоящего времени. Несмотря на достигнутые результаты в терапии больных с глубокими отморожениями конечностей, этот вопрос нельзя считать окончательно разрешенным. Продолжительные сроки и неудовлетворительные результаты, значительный процент инвалидности после отморожений обязывают изыскивать возможности улучшения исходов лечения данной категории пострадавших.

Местная холодовая травма в общей структуре травматических повреждений в мирное время в зоне с умеренным климатом занимает около 1%, а в Сибири, на Дальнем Востоке и в Северных регионах, достигает 6-20% (Скворцов Ю.Р. и соавт., 2002, Лебедь А.А. и соавт., 2010).

Проблема оказания помощи больным с отморожениями имеет не только медицинское, но и большое социально-экономическое значение. Материальные затраты на лечение пострадавших с отморожениями в 3 раза превышают стоимость лечения общехирургических больных (Брегадзе А.А., 2006), а средняя продолжительность нахождения этих пациентов в отделениях термической травмы более чем в 2 раза превышает длительность лечения больных с ожогами. Несмотря на значительные успехи в терапии пострадавших от холода, результаты их лечения остаются малоутешительными. Выведение больных на инвалидность после перенесенных глубоких отморожений конечностей составляет от 20 до 84% (Волощенко К.А., 2002), что оказывает негативное воздействие на экономику и социальную сферу государства.

При оказании помощи пациентам с холодовой травмой в ранее сроки их при поступления в стационар, наряду с основными лечебными мероприятиями (согревание конечностей, первичная хирургическая обработка ран) ведущую роль играет инфузионная терапия, направленная на восстановление кровообращения в пораженных сегментах и ликвидацию последующих осложнений.

Вследствие криовоздействия происходит нарушение гемореологии пораженных тканей, что приводит к увеличению вязкости крови, гиперкоагуляционному синдрому, нередко заканчивающемуся тромбозом и омертвением тканей, которые влекут за собой развитие инфекционно-воспалительных осложнений. Естественно, патогенетически обоснованным является использование лекарственных препаратов и кровезаменителей, способствующих восстановлению нарушенной микроциркуляции.

Целью исследования явилась разработка комплексного лечения больных с глубокими отморожениями конечностей с использованием инфузионно-трансфузионной терапии.

Под наблюдением находилось 204 больных, которых распределили на 5 групп. В первую вошли 39 человек, поступивших в дореактивном и в первые часы раннего реактивного периода. После наложения теплоизолирующих повязок на пораженные сегменты и получения информированного согласия больного в течение 5 суток проводилась инфузионная терапия; она включала введение 400 мл реополиглюкина, углеводно-кристаллоидных растворов в среднем объеме до 2 л в сутки, никотиновой кислоты 1% - 4,0, эуфиллина 2,4% - 10,0, гепарина 20 000 ед. в сутки через 4 часа.

Вторую группу составили 37 человек, которым в пораженные конечности внутриартериально (путем пункции плечевой или бедренной артерии каждой конечности) инфузировали 1-2 раза в сутки смесь следующего состава: новокаин 0,25%-10,0, никотиновая кислота 1%-2,0, пентоксифиллин 2%-5,0, гепарин 5000 ед. После этого продолжали указанную выше инфузионную терапию.

В третью группу вошли 26 больных, которым после внутриартериальных инфузий в комплексной терапии вместо реополиглюкина вводили полиоксидин в аналогичной дозе.

Четвертая группа представлена 53 пострадавшими, которым вместо полиоксидина включали инфузии волювена в дозе 500 мл.

Пятую (группа сравнения) составили 49 человек; в связи с поздним поступлением в стационар им проводили дезинтоксикационное, противовоспалительное, симптоматическое и хирургическое лечение.

Исследования крови проводили четырехкратно – при поступлении больного в стационар до введения препаратов, после курса лечения (5 суток), через 10-15 суток и перед выпиской. В группе сравнения соблюдались те же сроки обследования.

Об эффективности лечения судили по числу и уровню ампутаций, которые подразделялись на минимальные (в пределах фаланг пальцев) и максимальные (уровень пястных, плюсневых костей и проксимальнее их), а также по изменениям показателей первичного и вторичного звеньев гемостаза, вязкости крови и динамике результатов иммунологических исследований.

Анализ результатов, представленных в табл., показал, что применение инфузионной терапии в комплексном лечении больных с глубокой холодовой травмой оказывает положительное влияние на течение отморожений. Использование внутриартериального введения применяемых препаратов с последующей инфузионной терапией существенно улучшает результаты лечения. Об этом свидетельствует то, что более, чем у половины пострадавших лечение закончилось выздоровлением без ампутаций, а калечащие операции с максимальным уровнем произведены у 4 пациентов, которым вводился реополиглюкин. В третьей группе больных после введения полиоксидина ни одной операции с максимальным уровнем не произведено. Подтверждена и высокая эффективность использования волювена в комплексном лечении пострадавших; хотя двум пациентам выполнены ампутации с максимальным уровнем, у них была сохранена опорная функция стоп, а у одного больного при поражении всех четырех конечностей произведена ампутация только одной стопы на уровне плюсневых костей. В группе сравнения наблюдали наибольшее количество ампутаций с максимальным уровнем, а лечение без ампутаций закончилось лишь у 4 больных; 3 больных умерли от сопутствующего отравления суррогатами алкоголя и развития почечно-печеночной недостаточности.

Таблица .

Количество и уровень операций у
больных с отморожениями конечностей

| Группы больных | n | Без ампутации | Минимальный уровень | Максимальный уровень | Умерли |
|---|---|---|---|---|---|
| Первая | 39 | 15 | 16 | 8 | - |
| Вторая | 37 | 21 | 12 | 4 | - |
| Третья | 26 | 17 | 9 | - | - |
| Четвертая | 53 | 31 | 20 | 2 | - |
| Пятая | 49 | 4 | 19 | 23 | 3 |

Положительное влияние включения полиоксидина и волювена в схему комплексной терапии больных с глубокими отморожениями конечностей связано с выраженным гемодинамическим и реологическим действием препаратов, а также их волемическим эффектом. Способность полиоксидина связывать воду в 3,5 раза выше, чем декстранов, и в 4 - чем отечественных препаратов гидроксиэтилкрахмала (Кочетыгов Н.И., 1990). Отек, возникающий при отморожениях, приводит к сдавливанию закисленных тканей нерастяжимых костно-фасциальных футлярах и фиброзно-костных туннелях, что приводит к повышению внутритканевого давления и вызывает вторичные нарушения микроциркуляции, компрессионную ишемию и местную асфиксию тканей (Король Л.Н. и соавт., 2002). Уменьшению их отека способствует высокосвязывающая способность полиоксидина. Такими же свойствами обладает и волювен. Кроме этого, за счет восстановления микроциркуляции создаются благоприятные условия для доставки кислорода к пораженным тканям. Об этом свидетельствуют положительные изменения показателей агрегационной способности тромбоцитов и снижение вязкости крови.

В результате исследований выявлено развитие гиперкоагуляционного синдрома с нарушением микроциркуляции крови у пострадавших с глубокими отморожениями конечностей. Использование предложенного нами комплексного лечения, включающего инфузионно-трансфузионную терапию, позволяет корригировать имеющиеся нарушения и улучшить результаты лечения этих больных, что подтверждает положительная динамика показателей коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза, а также вязкости крови.

Отмечены выраженные нарушения всех звеньев иммунитета; несмотря на определенный положительный эффект трансфузионной терапии, эти пострадавшие нуждаются в проведении иммунореабилитационных мероприятий.

Таким образом, проведенные исследования позволяют считать, что предложенная нами схема комплексного лечения пострадавших с глубокими отморожениями конечностей является патогенетически обоснованной, существенно улучшающей результаты их лечения.

**Литература**

1. Скворцов, Ю.Р. Отморожения в современной боевой патологии / Ю.Р.Скворцов, С.Х.Кичемасов // Третья научная конференция по проблеме “Холодовая травма” (18апреля 2002 г.). С.Пб., 2002. С. 72-76.

2. Социальные аспекты холодовой травмы / А.А.Лебедь, А.А.Брегадзе, С.Б.Ильгельдиев и [ др. ] //Вестник Российской Военно-медицинской Академии. Приложение. 2010. № 1 (29). С. 69.

3. Брегадзе, А.А. Ранняя диагностика и комплексное лечение отморожений нижних конечностей: автореф.дис. …канд.мед.наук / Брегадзе Андрей Анатольевич. Якутск, 2006. 20 с.

4. Волощенко, К.А. Проблемы оказания медицинской помощи пораженным с глубокими отморожениями конечностей в дореактивном периоде. / Третья научная конференция по проблеме “Холодовая травма” ( 18 апреля 2002 г.) СПб., 2002. С.20-21.

5. Король, Л.Н. Фасциотомия и остеоперфорация в лечении острой холодовой травмы /Л.Н.Король, Ю.Л.Старков, Г.В.Соколович // Третья научная конференция по проблеме “Холодовая травма” (18 апреля 2002 г.) СПб., 2002. С. 43-44.

6. Кочетыгов Н.И. Кровезаменители при лечении кровопотери и шока в эксперименте //Инфузионно-трансфузионная терапия при неотложных состояниях и травмах на догоспитальном этапе. Л., 1990. С. 20-26.

## ИЗМЕНЕНИЯ ЭЭГ ПРИ ОБЩЕЙ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ АЭРОКРИОТЕРАПИИ (-120°С) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

**Ломакин И.И., Кудокоцева О.В., Шило А.В., Бабийчук Г.А.**

*ИПКиК НАНУ, г. Харьков, Украина*

E-mail: iilomakin@mail.ru

Применение охлаждения, как общезакаливающего, профилактического и терапевтического фактора, общеизвестно. Одним из ведущих механизмов, обеспечивающих указанные эффекты холодового воздействия, являются вегетативные реакции, которые зависят от продолжительности воздействия, собственно температуры холодового агента и охватываемой площади. Постоянно совершенствующееся техническое оборудование значительно расширило возможности использования температурных воздействий на организм человека.

В представленных исследованиях рассмотрены вопросы гипотермического воздействия в условиях общей экстремальной аэрокриотерапии (ЭК) как терапевтического метода при хронической алкогольной интоксикации (ХАИ). Коррекция соматических и вегетативных нарушений, спровоцированных хроническим алкоголизмом, остается актуальной проблемой, несмотря на огромные возможности современной лекарственной терапии. Формирование психосоматических осложнений в остром периоде алкоголизма с последующим развитием тяжких органических поражений органов и систем и стойкими функциональными нарушениями после прекращения поступления этанола в организм (Абрамова Т.А., 2006) требует применения нетрадиционных подходов лечения для достижения стойкого терапевтического эффекта либо для многократного потенцирования эффекта традиционных методов терапии. Экспериментальное моделирование позволяет изучить механизмы терапевтического эффекта ЭК и обосновать рекомендации к ее клиническому применению.

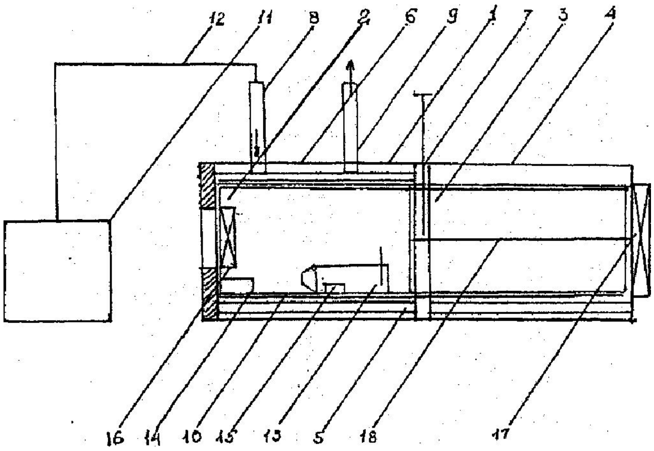



Рис. Схема криокамеры для экстремального охлаждения лабораторных животных

1 - термоизолированный корпус, 2 - рабочая камера и соединенная с ней шлюзовая камера 3 с герметичной крышкой 4; 5 - теплообменник, 6 - рабочий отсек, 7 - герметичная шторка, 8 - заливной клапан, 9 - канал отвода хладоагента, направляющие - 10 для перемещения рабочего отсека 6; 11 - программно-охлаждающее устройство, 12 - подача хладоагента, 13 - клетка с животными, 14 и 15 датчики, 16 – устройство для распределения хладоагента и контроля функционального состояния животных, приспособление 17 для распределения хладоагента соединено с рабочим отсеком 6 штоком 18.

Все эксперименты проведены в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986 г.). Работа выполнена на 6-8-мес. б/п крысах самцах массой 200–250 гр. Моделирование ХАИ осуществляли по стандартной методике (Ломакин И.И., Бабийчук Г.А., Мамонтов В.В., 2005). Электроды для регистрации биоэлектрической активности мозга и мышц имплантировали наркотизированным животным (смесь тиопентала в/б). Запись БЭА мозга и мышц проводили на компьютерном электрокардиографе «Нейрон-Спектр-2», амплитудный и частотно-спектральный анализ ЭЭГ и ЭМГ проводили с помощью программы "Нейрон-Спектр" («Нейрософт», Россия). Животные были разделены на 2 группы: контрольную (К) и группу с ХАИ. Обе группы подвергались действию ЭК (-120°С) в криокамере для экстремального охлаждения экспериментальных животных, разработанной в отделе криофизиологии ИПКиК НАН Украины (Бабийчук Г.А. и соавт., 2009).

Температура в криокамере контролировалась при помощи платиновых, метрологически аттестованных термометров сопротивления производства фирмы «Гера». Животные охлаждались по 4 раза (4 сеанса через каждые 24 часа) не более 2 мин за сеанс при температуре в камере – 120°С. Температура на поверхности кожи животных измерялась цифровым инфракрасным термометром "microlife 1DE1". Непосредственно после ЭК температура на поверхности бедра составляла 21,7±0,2°С (исходная 26,3±0,2°С), передней брюшной стенки - 24,2±0,4°С (26,7±0,1°С), головы - 21,6±0,2°С (25,1±0,2°С), ректальная - 36,4±0,1°С (36,7±0,2°С). У животных при ХАИ после ЭК температура составляла 19,3±0,2°С (исходная 25,8±0,2°С), 24,2±0,4°С (25,8±0,1°С), 19,6±0,2°С (24,9±0,2°С), 36,2±0,1°С (36,3±0,2°С), соответственно.

Проведение 4-х сеансов ЭК в группе контрольных животных приводит к развитию так называемых общемозговых изменений ЭЭГ - изменению регулярной ритмики (табл.1).

Таблица 1.

Влияние различных сеансов ЭК на амплитуду и индексы ритмов ЭЭГ у контрольных крыс

| Группа | Амплитуда, мкВ | Индексы ритмов, % | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ЭЭГ | дельта | тета | альфа | бета |
| Контроль | 28,4±3,6 | 58±13,8 | 15,8±3,0 | 16,2±1,6 | 13,8±0,7 |
| 1 ЭК | 12,6±2,2* | 60,8±9,6 | 13,8±2,4 | 12,4±0,4* | 12,6±1,2 |
| 2 ЭК | 14,8±2,2* | 64,6±14,4 | 15,2±2,4 | 7,2±2,4* | 12,6±0,2 |
| 3 ЭК | 43,6±9,4* | 68,8±8,6 | 18,2±1,2 | 8,4±2,4* | 10,8±0,7* |
| 4 ЭК | 15,4±1,6* | 60,2±17,2 | 12,4±2,6 | 14,6±3,3 | 16,2±4,6 |

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем, ($p < 0,05$), ($n=6$)

Последовательное проведение 4-х сеансов ЭК отражалось на амплитуде и индексах ритмов ЭЭГ в контрольной группе (табл. 1).

Отмечалось двухкратное снижение амплитуды после 1-го и 2-го сеансов ЭК с тенденцией к повышению дельта ритма и снижением альфа и бета ритмов. Особенно это проявляется после 3-го сеанса ЭК, когда на фоне достоверного увеличения амплитуды и сохраняющейся тенденции к увеличению индекса ритмов в дельта и тета диапазонах сохраняется достоверное снижение в альфа и бета диапазонах. Эти данные согласуются с ранее проведенными исследованиями по анализу сердечного ритма (Бабийчук В.Г., 2010, Ломакин И.И., Кудокоцева О.В., 2013) и данным проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейромедиаторов (Бабійчук В.Г., Марченко В.С., Марченко Л.М., 2008). Анализ ранее проведенных исследований и полученные в настоящем исследовании результаты ЭЭГ позволяют предположить, что после 3-го сеанса ЭК развитие адаптационно-компенсаторных реакций происходит на уровне формирования нарастающих стрессовых реакций на охлаждение. После 4-го сеанса ЭК определяется общая реакция, которую можно оценивать как начало формирования реакции компенсации. У контрольных животных отмечается снижение индексов в дельта и тета диапазонах с увеличением до контрольных значений в альфа и особенно в бета диапазонах (табл. 1 и 2).

Таблица 2.

Влияние 4-х сеансов ЭК на амплитуду и индексы ритмов ЭЭГ у крыс в контроле и при ХАИ

| Группа | Амплитуда, мкВ | Индексы ритмов, % | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ЭЭГ | дельта | тета | альфа | бета |
| Контроль | 28,4±3,6 | 58±13,8 | 15,8±3,0 | 16,2±1,6 | 13,8±0,7 |
| ХАИ | 25,6±4,4 | 68,8±12,4 | 12±0,8 | 16,4±1,4 | 14,8±1,2 |
| Контроль 4 ЭК | 15,4±1,6* | 60,2±17,2 | 12,4±2,6 | 14,6±3,3 | 16,2±4,6 |
| ХАИ 4 ЭК | 32,8±3,9 | 72,2±12* | 11,6±2* | 9,4±4,0* | 8,6±1,6* |

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем, ($p < 0,05$), (n=6)

В группе животных с ХАИ, несмотря на повышение двигательной активности и роли центральных механизмов в вегетативную регуляцию (Ломакин И.И., Кудокоцева О.В., 2013), изменения уровня функциональной активности мозга на ЭЭГ после ЭК представлены повышением амплитуды и низкоамплитудными высокочастотными нерегулярными колебаниям, которые можно оценивать как десинхронизованную активность. При этом максимальные сдвиги по отношению к контролю проявляются для дельта активности и особенно для тета активности, но их направленность неодинакова, в том числе для разных областей локализации. Подобная рассогласованность на фоновой ЭЭГ у крыс с ХАИ после 4-го сеанса ЭК в виде снижения индексов в дельта-, альфа- и бета- диапазонах происходит на фоне возрастания медленных ритмов. Как показали ранее проведенные в лаборатории криофизиологии исследования (Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Марченко Л.М., 2008, Ломакин И.И., Кудокоцева О.В., 2013), нейромедиаторные, вегетативные и функциональные процессы проницаемости гисто-гематических барьеров при холодовых воздействиях в определенной степени взаимозависимы, поэтому эффект ЭК при энцефалопатии при ХАИ можно рассматривать с положительным вектором направленности.

Таким образом, изменения уровня функциональной активности мозга при ХАИ на ЭЭГ представлены низкоамплитудными высокочастотными нерегулярными колебаниям, которые можно оценивать как десинхронизованную активность. При этом максимальные сдвиги при ХАИ, по отношению к норме, проявляются для дельта и тета активностей, но их направленность неодинакова для разных областей локализации. Темп изменений ЭЭГ-электрогенеза головного мозга при ЭК ускорен и направлен в сторону возрастания медленной активности и снижения альфа и бета составляющих. Замедление частоты альфа ритма при ЭК в основном связано со снижением метаболических процессов. Рассогласованность на фоновой ЭЭГ наблюдается у крыс с ХАИ на различных этапах ЭК, что связано с исходным изменением метаболических процессов, способности восприятия и интегративной деятельности, снижением лабильности.

## Литература

1. Абрамова Т.А. Динамика интеллектуально-мнестических, эмоциональных нарушений и астенических расстройств у больных, перенесших алкогольный делирий: автореф. дис. …канд. мед. наук. Москва, 2006. 28 с.

2. Ломакин И.И., Бабийчук Г.А., Мамонтов В.В. Экспериментальная модель алкоголизма в условиях воздействия низких температур // Проблемы криобиологии. 2005. № 3. С. 499-503.

3. Патент на корисну модель № 40168 (Україна) МПК$^7$ А61 В 18/00 Кріокамера для екстремального охолодження лабораторних тварин / Бабійчук Г.О., Ломакін І.І., Козлов О.В., Бабійчук В.Г., заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. заявл. 06.11.2008, надрук. 25.03.2009. БИ № 6.

4. Бабийчук В.Г. Механізми дії екстремально низьких температур на структурно-функціональний стан центральної нервової і серцево-судинної

систем у тварин різних вікових груп: автореф дис....д-ра мед. наук. Харків, 2010. 38 с.

5. Ломакин И.И., Кудокоцева О.В. Функциональная активность нейрогуморального звена вегетативной регуляции на показатели сердечного ритма у крыс в условиях хронической алкоголизации и воздействия аэрокриотерапии (-120 °С) // Матеріали міжн. наук.-практ. конф. «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики». Одесса: ГО «Південна фундація медицини», 2013. С. 74-80.

6. Бабійчук В.Г., Марченко В.С., Марченко Л.М. Структурно-функціональний стан гемато-енцефалічного бар'єра при ритмічній дії позитивних (12⁰С) і екстремально низьких (-120⁰С) температур // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. 2008. Т. 4, № 1. С. 68-74.

7. Ломакін І.І., Кудокоцева О.В. Вплив низьких температур (до -120⁰С) на функціональний стан ЦНС щурів в умовах експериментальної моделі хронічного алкоголізму // «Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії» Збірник матеріалів міжн. наук.-практ. конф. (16-17.08.2013, Київ) – Київ: Київський медичний науковий центр. 2013. С. 13–18.

## ВЛИЯНИЕ КРАНИОЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ

**Ломако В.В., Коваленко И.Ф.**

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

E-mail: victorial2003@list.ru

Краниоцеребральную гипотермию (КЦГ) применяют в комплексной интенсивной терапии кризисных состояний, сопровождающихся гипоксией головного мозга. Этот метод получил широкое распространение в практической медицине и имеет ряд несомненных преимуществ перед общим охлаждением организма (Шевелев О.А. и др., 2012). При КЦГ в первую очередь снижается температура наиболее чувствительных к кислородному голоданию церебральных структуры, в то время как температура «ядра» тела удерживается в пределах, существенно не влияющих на сердечную деятельность. Любые изменения в организме в значительной степени отражаются на состоянии системы крови, в частности ее высокоспециализированных клеток – эритроцитов. Относительно высокая однородность популяции эритроцитов по многим параметрам облегчает регистрацию любых изменений формы клеток, вызванных патологией в организме, воздействием физических факторов, или постановкой эксперимента in vitro. Даже простые эмпирические методы исследования эритроцитов оказываются достаточно информативными. Степень выраженности изменений морфологического состава крови зависит от длительности и глубины гипотермии организма, стрессорные эффекты охлаждения могут преобладать над защитными (Бринкевич В.Н., Мяделец О.Д., 1991; Гаркави Л.Х. др., 1990; Turk E.E., 2010).

Целью работы было изучить влияние КЦГ на соотношения обратимых и необратимых форм эритроцитов и динамику индексов их трансформации.

**Методы.** Работа выполнена в осенне-зимний период на белых крысах массой 180-220 г; половозрелых самцах 6-7 месячного возраста с соблюдением всех биоэтических норм. Животных до начала эксперимента содержали в условиях вивария при естественном световом режиме на стандартном рационе ad libitum.

КЦГ в течение 60$\pm$10 мин (до Тт=33,5$\pm$1,5 °С) осуществляли на специальной установке, созданной в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, на фоне блокады центров терморегуляции (ЦТ) наркозом (смесь тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 и 100 мг/кг массы соответственно).

Исследования динамики трансформации эритроцитов проводили методом малоуглового рассеяния света на приборе НПФ «Криокон» (Украина), разработанном в ИПКиК НАН Украины. Изучали зависимость интенсивности рассеяния света суспензией эритроцитов под углом 9° по направлению к падающему лучу от количества клеток в этой суспензии. В измерительную ячейку, содержащую 3,0 мл раствора NaCl различной концентрации (от 0,15 до 0,05 Моль/л), вносили 30 мкл эритромассы, полученной после отстаивания крови и аспирации плазмы. Все исследования проводили при температуре 37 °С. Определяли долю сохранных клеток. Распределение эритроцитов по индексу сферичности (ИС) вычисляли из зависимостей ОХ, используя физико-математическую модель гипотонического гемолиза эритроцитов в растворе непроникающего вещества (Gordiyenko O.I. et al., 2004). Значения ИС прямо пропорциональны поверхностно-объемному соотношению (S/V) и характеризуют форму клеток. Преобладающие формы эритроцитов соответствовали следующим интервалам ИС: сфероциты (1-1,3) – необратимая форма, стоматоциты (1,3-1,7) – обратимая форма, нормальные (1,7-2,1) и уплощенные (2,1-3) дискоциты. Используя полученные значения обратимо и необратимо измененных форм эритроцитов, рассчитывали следующие индексы (Медведев И.Н. и др., 2009): индекс трансформации (ИТ) = (ОД+НД)/Д; индекс обратимой трансформации (ИОТ) = ОД/Д, индекс необратимой трансформации (ИНОТ) = НД/Д, индекс обратимости (ИО) = ОД/НД, где Д – процент дискоцитов; ОД – процент обратимо деформированных эритроцитов и НД – процент необратимо деформированных эритроцитов.

Статистическую обработку данных проводили методом непараметрической статистики Крускала-Уоллиса с помощью программного обеспечения Statistica 6.0.

**Результаты и обсуждение.** В основе расчета индексов трансформации лежат соотношения дискоцитов, обратимо (стоматоциты) и необратимо (сфероциты) измененных форм красных клеток крови, значительно расширяющие представление о процессах трансформации эритроцитов. В наших экспериментах в образцах крови крыс после КЦГ наблюдались тенденция к снижению количества дискоцитов и увеличение обратимо и необратимо измененных форм эритроцитов (табл.). При этом отмечено достоверное увеличение индекса трансформации, индексов обратимой и необратимой трансформации при значительном понижении величины индекса обратимости (почти в 2,5 раза). Через 24 ч после КЦГ направленность изменений изученных показателей, кроме ИТ, такая же, но более выраженная, особенно для ИНТ (почти в 6 раз). Наркоз приводил к увеличению необратимых форм эритроцитов, повышению ИНТ и снижению ИОТ и ИО.

Таблица.

Соотношение форм эритроцитов и индексы их трансформации (n=5)

| Показатели | Условия эксперимента | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Контроль | Наркоз | КЦГ | КЦГ 24 ч |
| Соотношение форм эритроцитов | | | | |
| Дискоциты, % | 57,95±2,03 | 57,54±4,2 | 49,74±7,92 | 51,84±5,91 |
| Обратимые формы, % | 40,82±2,84 | 38,15±3,17 | 46,5±8,0 | 44,88±6.49 |
| Необратимые формы, % | 1,22±0,5 | 4,12±2,76 | 3,66±0,3* | 7,3±2,3* |
| Измененные формы, % | 42,05±2,3 | 42,27±4,11 | 50,16±7,83 | 52,74±5,74* |
| Индексы | | | | |
| Трансформации | 0,73±0,07 | 0,85±0,12* | 1,2±0,42* | 0,84±0,07 |
| Обратимой трансформации | 0,71±0,06 | 0,7±0,1 | 1,19±0,41* | 0,69±0,07 |
| Необратимой трансформации | 0,021±0,008 | 0,078±0,024* | 0,08±0,01* | 0,134±0,051* |
| Обратимости | 28,29±6,05 | 13,32±3,66* | 13,42±3,01* | 21,79±14,89 |

*- различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p<0,05$, (M±SE)

Эритроциты в виде диска наиболее адаптированы к диффузии газов и транспорту различных веществ через плазмолемму; они легко проходит по капиллярам, вдвое меньшего диаметра. Эти свойства обусловлены относительно низкой вязкостью нормального гемоглобина и эластичностью клеточной мембраны. Трансформация дискоцита в стоматоцит является результатом метаболических нарушений в клетке. Сферические формы эритроцитов имеют пониженную эластичность, в связи с этим они задерживаются в фильтрационном ложе селезенки и уничтожаются макрофагами. Увеличение количества сфероцитов в крови свидетельствует о патологических отклонениях в организме, наследственно детерминированных или приобретенных вследствие действия повреждающих факторов (Козинец Г.И. и др., 2002; Новодержкина Ю.К. и др., 2004).

Трансформация эритроцитов имеет адаптационно-приспособительное значение (Козинец Г.И. и др., 2002). Снижение ИТ и увеличение ОТ демонстрируют ригидность эритроцитарной системы за счет усиления эритродиереза нестойких форм эритроцитов, являются показателями, отражающими адаптационные реакции системы эритрона (Верещак Е.В.. 2008). Известно, что изменения формы эритроцитов во многом определяются процессами ПОЛ в их мембране, они активируются при гипотермии (Саидов М.Б., Эмирбеков Э.З., 2009), как и при любых стрессорных воздействиях. Мембранодеструктивный эффект активации ПОЛ вызывает нестабильность мембран и способствует быстрому разрушению нестойких форм эритроцитов, что является стереотипной реакцией системы крови (Козинец Г.И. и др., 2002). Напряжение неспецифических адаптационных реакций приводит к увеличению количества обратимо измененных форм эритроцитов, согласно Гаркави Л.Х. др. (1990), многие из процессов адаптации, протекающих с напряжением и возможным истощением, при определенных условиях могут стать тренирующими, о чем может свидетельствовать тенденция к повышению ИО через 24 ч после КЦГ. Подтверждением этому также могут служить полученные ранее данные о повышении холодовой устойчивости гомойотермного организма (значительное увеличение длительности плавания в холодной воде 0°С) через 24 и 48 ч после КЦГ до 32 °С (Ломако В.В. и др., 1994).

**Литература**

1. Бринкевич В.Н., Мяделец О.Д. Количественные изменения периферической крови при пролонгированной гипотермии // Проблемы криобиологии. 1991. № 3. С. 25-28.

2. Верещак Е.В. Исследование адаптационных возможностей эритроцитов периферической крови у работников газовой промышленности: Автореф. дис.канд.мед.наук. Саратов, 2008.

3. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов-на-Дону. 1990.

4. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др. Клетки крови и современные технологии их анализа - М.: Триада-фарм, 2002. 534 с.

5. Ломако В.В., Марченко В.С., Бабийчук Г.А. и др. Общий подход к проблеме повышения проницаемости гемато-энцефалического барьера и холодовой устойчивости организма // Проблемы криобиологии. 1994. № 1. С. 24-32.

6. Медведев И.Н., Савченко А.П., Завалишина С.Ю., Краснова Е.Г. Методические подходы к исследованию реологических свойств крови при различных состояниях // Российский кардиологический журнал. 2009. № 5. С. 42-45.

7. Новодержкина Ю.К., Шишканова З.Г., Козинец И.Г. Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии. М.: Триада-фарм, 2004. 151 с.

8. Саидов М.Б., Эмирбеков Э.З. Перекисное окисление липидов в эритроцитах крыс при гипотермии и введении даларгина // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2009. № 1. С. 70-73.

9. Шевелев О.А., Бутров А.В., Билибин Д.П. и др. Нейропротективные свойства гипотермии // Совр. проблемы науки и образования. 2012. № 3. www.science-education.ru/103-6378 (дата обращения: 23.02.2014)

10. Gordiyenko O.I., Gordiyenko Yu.E., Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution // Bioelectrochemistry. 2004. Vol. 62. P.119– 122.

11. Turk E.E. Hypothermia // Forensic. Sci. Med. Pathol. 2010.Vol. 6, № 2. P. 106–115.

## ОСОБЕННОСТИ МИКРОГЕМОЦИРКУЛЯЦИИ В КОЖЕ И МЫШЦАХ КРЫС ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАЦИИ

**Луценко Д.Г., Слета И.В., Марченко В.С.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*
E-mail: ludg@mail.ru

Стойкая холодовая адаптация у млекопитающих развивается как после нескольких недель пребывания при пониженной температуре, так и при длительном использовании кратковременных регулярных холодовых воздействий. При этом высказываются предположения о существовании разных механизмов формирования адаптации к холоду. (Heroux O., 1963**;** LeBlanc J., 1967.;Пастухов и др., 2003; Deveci D., Egginton S., 2002; Bittel J.H., 1987). Хотя роль сердечно-сосудистой системы в обеспечении терморегуляции хорошо известна, имеются единичные исследования, посвященные изучению влияния различных режимов холодовой акклимации на региональное кровообращение (Hauton D. et al., 2011).

Цель работы – сравнить микрогемоциркуляцию в коже и скелетных мышцах у крыс после разных режимов длительной холодовой акклимации.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены с соблюдением всех биоэтических норм при работе с лабораторными животными. Работа выполнена в осенне-зимний период на белых беспородных крысах, которых до начала экспериментов содержали в условиях вивария.

Непрерывная холодовая акклимация (НХА) достигалась путем постоянного содержания животных при температуре 5°С в течение 1 месяца, крысы содержались по 3 животных в клетке с пластиковым дном и слоем опилок, без предоставления «гнездового материала». При ритмической холодовой акклимации (РХА) животные содержались по двое, при этом их в течение 1 месяца обдували холодным воздухом (скорость потока 6,5 м/с) с температурой 10°С 15 раз в сутки по 15 минут в начале каждого часа, последующие 45 мин они находились при температуре 22-24°С.

Животные были разделены на 3 группы: 1 – контроль (n=5); 2 – крысы с НХА (n=6); 3 – крысы с РХА. (n=6). Микрогемоциркуляцию кожи и мышц на внутренней поверхности бедра изучали у наркотизированных животных методом прижизненной микроскопии в поляризованном свете с помощью микроскопа ЛЮМАМ К-1, снабженного средствами фото- и видеорегистрации. Полученные изображения обрабатывали при помощи программ FRAM и AxioVision. (Луценко Д.Г. и др., 2008).

**Результаты и обсуждение.** После НХА наблюдалось достоверное увеличение диаметра прекапилляров, собственно капиляров и посткапилляров в коже по сравнению с контрольным уровнем. В мышечной ткани также наблюдалось достоверное увеличение диаметра всех капиллярных сосудов В то же время диаметры венул и артериол достоверно не отличался от показателей контрольных животных, хотя в случае с артериолами в скелетной мышце наблюдалась тенденция к снижению диаметра артериол.

После РХА в коже диаметры артериол, прекапилляров и венул достоверно не отличались от контрольных животных. Но при этом диаметр прекапилляров после РХА был достоверно меньше чем у животных после НХА. В то же время диаметр посткапилляров после РХА не отличался от показателей, зарегистрированных у животных после НХА, но был достоверно больше, чем у контрольных животных. В мышцах наблюдалась другая картина. Диаметр артериол и венул после РХА не отличался от контрольных животных, однако диаметр артериол после РХА достоверно был больше, чем у животных после НХА. Что же касается пре- и посткапилляров, то их диаметры были больше, чем у контрольных животных, а диаметры посткапиллляров были достоверны меньше, чем после НХА.

Все вышесказанное показывает, что в случае применения непрерывного и прерывистого режимов холодовой акклимации наблюдается различная реакция микрососудистого русла в коже и мышцах. Наши данные по НХА соответствуют наблюдениям (Deveci D., Egginton S., 2002), которые показали, что при длительной непрерывной холодовой акклимации в мышцах m. tibialis anterior у крыс отмечается гипертрофия капилляров, при неизменности плотности капилляров.

Увеличение относительной площади, занимаемой микрососудами в поле зрения в мышце крыс при РХА также соответствует литературным данным (Suzuki J., 2003), показавшим незначительное облегчение капилляpогенеза в мышцах soleus muscle после длительной прерывистой акклимации**.**

К сожалению, даже предполагая существование различных механизмов формирования адаптации к холоду при разных режимах акклимации/акклиматизации организма, авторы не останавливались подробно на микроциркуляторном звене, анализируя изменения на гормональном уровне, изменения в приросте массы как всего организма, так и отдельных органов.

Одним из возможных механизмов наблюдаемых изменений в микроциркуляторном русле после РХА и НХА может быть разное изменение реактивности рецепторов к вазоактивным веществам в процессе выработки адаптации к холоду. Так, исследование на кроликах показало, что длительное прерывистое холодовое воздействие приводит к изменению реактивности разных групп холино- и адренорецепторов в микрососудах, в частности, после адаптации к холоду реактивность периферических артерий конечности на все дозы норадреналина была меньше контроля (Ананьев В.Н. 2010а, 2010б). В работах по изучению микроциркуляции пиального русла крыс было обнаружено, что в разных участках ветвления микрососудистого русла преобладают либо альфа- либо бета-адренорецепторы (Горшкова О.П. и др., 2011). Поэтому одним из механизмов, объясняющих различия в поведении микрососудов разного порядка ветвления при ритмической и непрерывной холодовых аклимациях может быть разный уровень адреналина и/или норадреналина в крови, влияющих на альфа- и бета-адренорецепторы сосудов соответственно.

Кроме того, норадреналин и ГАМК могут оказывать влияние на микрососуды через оксид азота (Peppiatt C.M. et al, 2006). И нами также было показано повышение концентрации продуктов обмена оксида азота в сыворотке крови при ритмических холодовых воздействиях (Lutsenko D. et al, 2011).

Таблица.

Показатели микроциркуляторного русла при различных режимах длительной холодовой акклимации, (M±SD)

| | контроль | РХА | НХА |
|---|---|---|---|
| кожа | | | |
| Диаметр артериол, мкм | 10,57±2,16 | 8,77 ±1,07 | 9,57 ±1,62 |
| Диаметр прекапилляров и капилляров, мкм | 5,02 ±0,38 | 4,84 ±0,48** | 6,06 ±0,33* |
| Диаметр посткапилляров, мкм | 8,49 ±0,55 | 10,21 ±0,91* | 10,10 ±0,85* |
| Диаметр венул, мкм | 29,84 ±4,50 | 30,83 ±3,96 | 30,77 ±4,71 |
| Относительная площадь, занимаемая микрососудами в поле зрения, % | 17,62 ±5,10 | 23,98 ±7,98 | 25,85 ±3,25 |
| мышца | | | |
| Диаметр артериол, мкм | 9,13±1,13 | 9,93 ±0,84** | 7,75 ±1,15 |
| Диаметр прекапилляров и капилляров, мкм | 4,25 ±0,21 | 6,11 ±0,12* | 5,74 ±0,15* |
| Диаметр посткапилляров, мкм | 5,37 ±0,22 | 6,81 ±0,18* ** | 8,15 ±0,26* |
| Диаметр венул, мкм | 16,24 ±2,87 | 15,65 ±2,16 | 15,73 ±1,85 |
| Относительная площадь, занимаемая микрососудами в поле зрения, % | 15,06 ±0,51 | 20,49 ±0,48 * | 18,52 ±1,68 |

* - различия достоверны ($p<0,05$) по отношению к контролю

** - различия достоверны ($p<0,05$) по отношению к НХА

**Заключение.** Таким образом, показано, что применение непрерывного и прерывистого режимов холодовой акклимации приводит к различной реакции микрососудистого русла в коже и мышцах крыс. Что может подтверждать существование различных физиологических механизмов при разных режимах формировании адаптации к холоду.

**Литература**

1. Ананьев В.Н. Реактивность кровообращения к ацетилхолину при адаптации к холоду // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология», Вып.18, С. 7-13. (2010a)

2. Ананьев В.Н. Холодовая адаптация и адренорецепторы // Успехи совр. естествознания №11, С. 8-11 (2010б)

3. Горшкова О.П., Шуваева В.Н., Костылев А.В., Дворецкий Д.П. Об особенностях адренореактивности пиального артериального русла у крыс в условиях стабилизации системного артериального давления // БЭБиМ, Т.151, №5, С. 484-487. (2011)

4. Луценко Д.Г., Марченко В.С., Слета И.В. Применение фрактального анализа для комплексной оценки структурно-функционального состояния микрогемоциркуляции у крыс после общей гипотермии // Пробл. криобиологии. Т. 18, №.3, С.391-393. (2008).

5. Пастухов Ю.Ф., Максимов А.Л.,. Хаскин В.В Адаптация к холоду и условиям Субарктики: проблемы термофизиологии // Магадан: СВНЦ ДВО РАН, Т.1. (2003)

6. Bittel J.H. Heat debt as an index for cold adaptation in men // J Appl Physiol. V.62, N 4, P. 1627-1634. (1987)

7. Deveci D., Egginton S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters //The Journal of Experimental Biology V.205, N 6, P. 829–840. (2002)

8. Hauton D., May S., Sabharwal R., Deveci D., Egginton S. Cold-impaired cardiac performance in rats is only partially overcome by cold Acclimation// The Journal of Experimental Biology V.214, N 18, P. 3021-3031. (2011)

9. Heroux O. Patterns of Morphological, Physiological, and Endocrinological Adjustments under Different Environmental Conditions in Cold. Fed. Proc. V. 22, N 3, P. 789-794. (1963)

10. LeBlanc J. Adaptation to cold in three hours.// American Journal of Physiology V. 212, N 2, P. 530-532. (1967)

11. Lutsenko D.G., Marchenko V.S., Babiychuk V.G. NO-Dependent Mechanisms of Rhythmic Cold Exposures on Functional Architectonics of Microhemocirculatory Bed in Rat Brain // Probl. of Cryobiol. V.21, N 2, P.117-124. (2011)

12. Peppiatt C.M., Howarth C., Mobbs P., Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes // Nature V. 443, N 12, P 700-704. (2006)

13. Suzuki J. Effects of chronic intermittent cold exposure on microvascular angioadaptation in rat soleus muscle// Journal of Winter Sport V.6, N1, P. 1-7. (2003).

**УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ В СЛАБОЭЛЕКТРОЛИТНЫХ СРЕДАХ И НОРМОТЕРМИЧЕСКОЙ РЕПЕРФУЗИИ**

**Репин Н. В., Говоруха Т.П., Марченко Л.Н.**
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина*
E-mail: nvrepin@mail.ru

Целью настоящей работы явилось проведение сравнительного анализа морфологического состояния изолированной и перфузированной (4°С) печени крыс, хранившейся при гипотермии (ГХ) в течение 1 и 24 часов в сахарозосодержащей (СС), манитсодержащей (МС) и UW средах, а также после ее нормотермической реперфузии (НТРП).

**Объект и методы исследования.** Исследования проводили на беспородных крысах-самцах (200-250г), с использованием ингаляционного эфирного наркоза и согласно правилам "Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других исследовательских целях". Печень анестезированных животных перфузировали in situ охлажденным до 4 °С консервирующим раствором объемом 50 мл через портальную вену с перфузионным давлением 12 мм. рт. ст. В качестве растворов для гипотермического хранения печени использовали общепринятую UW-среду (Kozlova I., 2003), а также среды СС и МС (pH 5,4), содержащие 260 мМ сахарозы или манита, 14 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 3 мМ $CaCl_2$. Все экспериментальные манипуляции и подготовку для электронно-микроскопических исследований проводили аналогично изложенному в работе (Репин Н.В.,2006).

Электронно-микроскопический анализ состояния ультраструктуры различных участков печени показал, что краткосрочное, 1-часовое ГХ изолированной и предварительно перфузированной печени позволяет сохранить в трех средах на достаточно высоком уровне ее биохимические и морфологические характеристики: сохранение трабекулярного строения печеночных долек, ультраструктуры эндотелиальной выстилки синусоидов и гепатоцитов. Стенки центральной вены и сосудов зоны триад, а также соединительно-тканные прослойки имели незначительные разрыхление и вакуолизацию. В СС в некоторых клетках наблюдается диффузная гомогенизация митохондрий и их агрегация в конгломераты. Нормотермическая реперфузия печени после 1 часа ГХ в СС не оказывала существенного влияния на структуру клеток печеночной паренхимы, однако в микроциркуляторном русле органа отмечались существенные реактивные изменения (рис. 1).

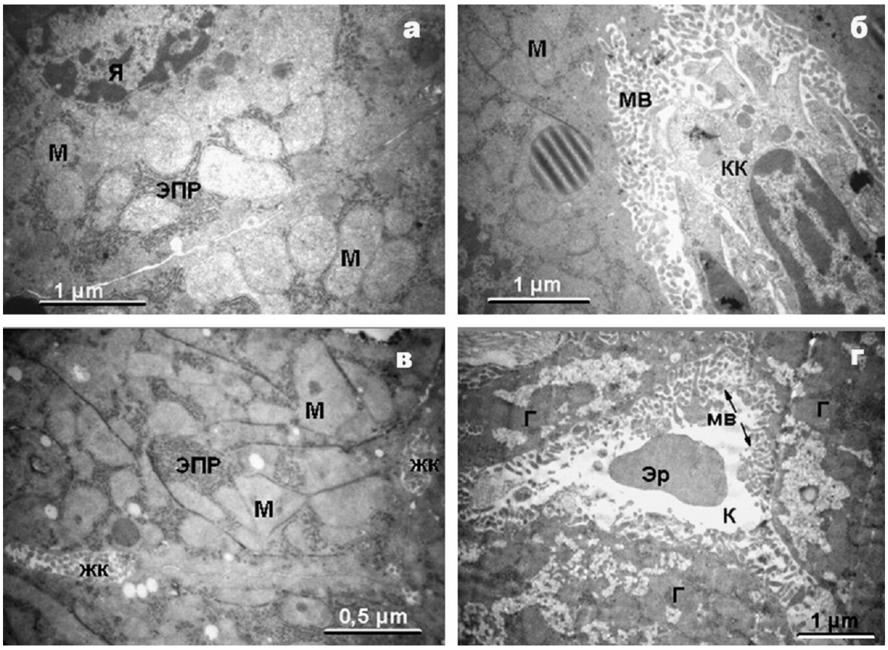



Рис. 1. Ультраструктура фрагмента гепатоцита (а) и фрагмента синусоидного капилляра (б) после 1 ч (а-б) и 24 часов (в,г) гипотермического хранения печени в СС и последующей нормотермической реперфузии Обозначения: Г – гепатоциты, М – митохондрии, ЭПР – скопление рибосом и фрагментов ретикулума, Я – ядро, Эр – эритроцит, ЖК – желчные капилляры, К – просвет капилляра, кК – клетка Купфера; МВ – микроворсинки

Нормотермическая реперфузия после 24 часового хранения органа приводит и к значительному ухудшению ультраструктуры всех клеточных компонентов ткани печени, что дает основание считать этот срок закритическим для подготовки и хранения целого органа в СС.

Анализ элиминации цитозольных ферментов в среду НТРП показал, что 24-часовое хранение изолированной печени крыс в СС и последующая реперфузия приводят к увеличению активности в среде реперфузии ферментов ЛДГ и АсАТ почти в 2 раза, а АлАТ в 4 раза, по сравнению с 1-часовым хранением органа в таких же условиях.

В UW- и МС средах после 1-часового ГХ изолированной печени и последующей НТРП также наблюдались сохранение синусоидов и трабекулярного строения печеночных долек, целостность гепатоцитов и некоторые особенности их структуры в зависимости от локализации печеночных клеток внутри дольки, а также отсутствие признаков аутолитических повреждений гепатоцитов и эндотелиальных клеток синусоидов. Гликоген, в значительном количестве присутствует в гепатоцитах в МС- среде и, практически, отсутствует в клетках, хранившихся в среде UW. В пространстве Диссе отмечается нормальное распределение микроворсинок в среде UW, тогда как в МС их гораздо меньше и они короче (рис. 2).

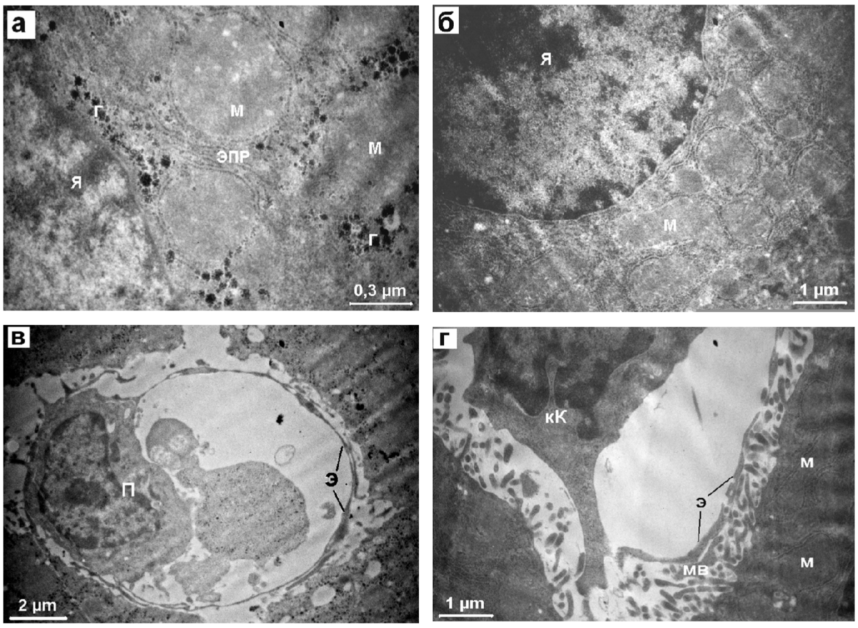



Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов (а, б) и синусоидных капилляров (в, г) после 1 ч ГХ и последующей 60-мин НТРП органа, хранившегося в МС (а, в) и UW (б, г) средах. Обозначения: М – митохондрии; Я – ядро; МВ – микровилли; Э-эндотелий; кК– клетка Купфера, П – перицит: ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Г – розетки гликогена.

Нормотермическая реперфузия после 24-часового ГХ изолированной печени в МС- и UW средах приводила, в обеих средах, к нарастанию структурных повреждений гепатоцитов и синусоидальных клеток по сравнению с реперфузией после 1-часового ГХ. Несмотря на сохранность структуры дольки, гетерогенность формы гепатоцитов и изменение их внутреннего содержимого выражены в большей степени (рис.3).

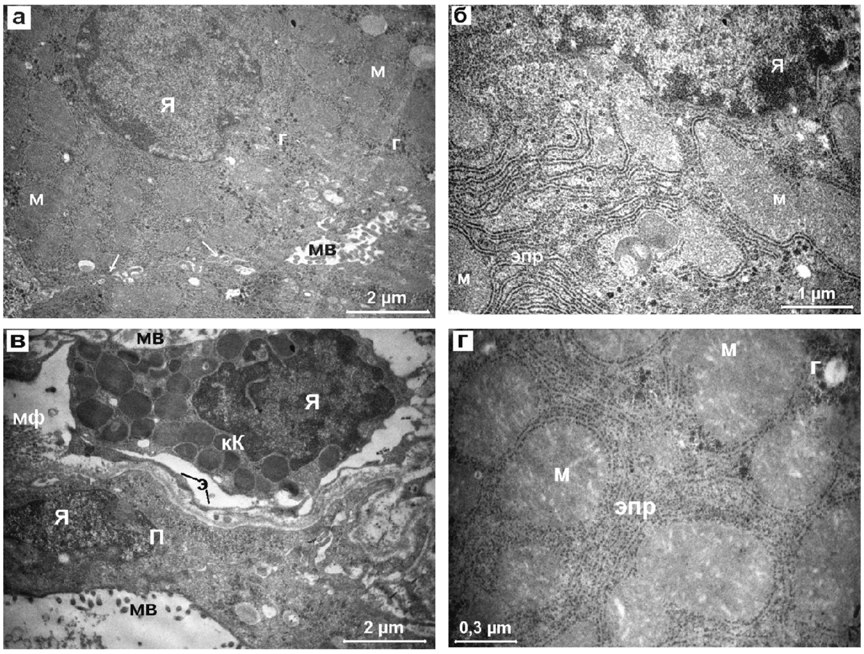



Рис. 3. Ультраструктура гепатоцитов (а, б, г) и синусоидного капилляра (в) после 24 ч ГХ и последующей 60-мин НТРП органа, хранившегося в МС (а, в, г) и UW (б) средах. Обозначения: М – митохондрии; МВ – микроворсинки; Э – эндотелий; кК – клетка Купфера; П – перицит. ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Г – розетки гликогена; Я – ядро.

Таким образом, пролонгирование до 24 часов ГХ печени приводит к более выраженным изменениям в структуре всех клеточных компонентов ткани, что исключает (ограничивает) возможность их репарации на этапе реперфузии и является критическим сроком для восстановления их функций в данных средах после НТРП.

Для данных сред в отличие от сахарозной среды в ультраструктуре клеток не наблюдалось значимого увеличения доли конденсированного хроматина, чрезмерного набухания, гомогенизации митохондрий и дезорганизации их крист, фрагментации, вакуолизации и расширения цистерн ЭПР – признаков, которые обычно связывают со снижением активности, нарушением ядерного аппарата и клетки в целом. Ряд отличий (структура ЭПР, уровень гликогена, число микроворсинок и т.п.), отмечаемых в структуре ткани печени, подвергнутой НТРП после 1 и 24 ч ГХ в МС- и UW средах при одинаковых экспериментальных воздействиях, с нашей точки зрения в значительной степени связаны с pH раствора.

Состав консервирующего раствора имеет существенное значение для сохранения клетки в ходе гипотермии. С большой долей вероятности можно утверждать, что эффективность среды UW, а также других сред во многом обусловлена высоким содержанием в них $K^+$. С нашей точки зрения, одним из реальных вариантов замедления выхода ионов $K^+$ из клетки, является присутствие ионов водорода, что реализуется в среде с пониженным значением pH. Как было показано ранее (Репин Н.В., 2012), в эритроцитах при хранении потеря внутриклеточного калия была меньше в средах с пониженным значением pH.

**Литература**

1. Kozlova I. Preservation of mouse liver tissue during cold storage in experimental solutions assessed X-Ray microanalysis / I. Kozlova, Y. Khalid, G. M. Roomans // Liver Transplantation. 2003. V. 9, № 3. P. 268–278.

2. Репин Н.В. Морфологические и биохимические признаки повреждения печени при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащем растворе / Н.В. Репин, Е.Н. Ткачева, О.А. Семенченко [и др.] // Експериментальна і клінічна медицина. 2006. № 3. С. 51-56

3. Репин Н. В. Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4°С в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования / Н. В. Репин, Т. Н. Юрченко // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / под ред. А. Н. Гольцева. Харьков, 2012. С. 165–206.

## ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКОГО ХОЛОДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬПАИНОВ У КРЫС С АЛКОГОЛЬ-ЗАВИСИМОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

**Самохина Л.М.*, Бабийчук Г.А., Ломако В.В.**

**ГУ «Национальный институт терапии им. Л.Т.Малой НАМН Украины»,*

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

E-mail: lub.samokhina@yandex.ua

Кальпаины (ЕС 3.4.22.17) - Ca(2+)-зависимые протеиназы с папаин-подобной активностью - представляют собой семейство цитоплазматических цистеиновых энзимов (D'Orsi B. et al., 2012). Они участвуют в клеточных процессах в норме и при патологии на различных уровнях функционирования живого - от молекулярных взаимодействий до физиологических процессов в организме (Goll D.E. et al., 2003). Различают μ-кальпаины и m-кальпаины, которые активируются при микро - и миллимолярных концентрациях Ca(2+), соответственно. Активацию μ-кальпаинов в числе других протеаз отмечают в результате воздействия на организм этанола от низкой до умеренной (25-50 мМ) концентрации (Samantaray S. et al., 2013). При этом следует отметить, что у крыс самцов, по сравнению с самками, суммарная активность кальпаинов в контроле имеет более высокий уровень, а при алкоголь-зависимой гипертензии (АЗГ) – более низкий, что связывают с возможным ускоренным развитием вазоконстрикторных изменений, большей склонностью самцов к развитию гипертензии, а также расходованием кальпаинов и отсутствием их синтеза (Самохіна Л.М., Ломако В.В., 2011). Возможно, наблюдаются условия низкого уровня Ca(2+), недостаточные для проявления основных свойств этого типа энзимов - их автолиза, протеолитической активности и регуляции ингибиторами. Вопрос активации кальпаинов в клетке в таких условиях остается одним из нерешенных в настоящее время.

В эксперименте показано, что ритмическое холодовое воздействие (РХВ) с частотой, близкой к эндогенным ритмам 0,1 Гц, оказывает стимулирующий эффект на организм, способствуя активации энзимов у крыс со стресс-стимулированной гипертензией (Самохина Л.М., 2003). Характер влияния РХВ на активность кальпаинов в условиях алкоголизма не изучен.

Цель исследования - изучить эффекты РХВ на активность кальпаинов в эксперименте у крыс самцов с АЗГ.

**Методы.** В исследовании были задействованы 4 группы самцов крыс, из них 2 опытные группы: АЗГ, АЗГ+РХВ, группа сравнения - РХВ, интактные животные (контроль), n=5 в каждой группе. Возраст животных, у которых начинали моделировать АЗГ, составил 7-8 месяцев, групп сравнения и контроля - 17-18 месяцев.

Эксперименты проведены в соответствии с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Животных содержали в виварии на стандартном рационе.

Моделирование АЗГ проводили «двухбутылочным» методом, при наличии свободного выбора между водой и раствором этанола. Первую неделю крысы получали 5 % (по объёму) раствор этанола, 2-ю - 10 %, а третью и до конца эксперимента - 15 %. Общий срок алкоголизации составил 10 месяцев. Контроль систолического артериального давления проводили с использованием медицинского тонометра, манжету накладывали на хвост. Животных выводили из эксперимента путем декапитации в отсутствии других животных.

РХВ осуществляли с частотой 0,1 Гц в течение 65 мин, для этого использовали охлаждающее устройство с программным управлением, созданное в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, приспособленное для прерывистой подачи хладоагента (холодный воздух с температурой 5±1 °С).

Кровь собирали в центрифужные пробирки. Печень перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Ткани коры мозга (КМ), гипоталамуса, легких, сердца, печени и почек (300 мг) промывали охлажденным физиологическим раствором и гомогенизировали в 3 мл Na-фосфатного буфера pH 7.4 при 4-6 °С, затем кровь и полученные гомогенаты центрифугировали 10 мин при 5000 g на центрифуге РС-6 при 4 °С. Образцы сыворотки крови и безъядерных фракций гомогенатов тканей хранили при -20 °С до анализа.

В сыворотке крови, безъядерных фракциях гомогенатов тканей КМ, гипоталамуса, легких, сердца, печени и почек определяли активность кальпаинов твердофазным методом (Самохина Л.М., Дубинин А.А., 1989). Активность кальпаинов определяли как разницу между активностью протеиназ с добавлением $CaCl_2$ и цистеина до получения конечных концентраций 5 mM и активностью протеиназ с добавлением этилендиаминтетраацетата до получения конечной концентрации 10 mM (Zalewska T., Domanska-Janik K., 1990).

В экспериментах использовали пероксидазу хрена фирмы ‘’ICN’’ (США), трипсин фирмы Spofa (Чехия), хлорид кальция, цистеин, бычий сывороточный альбумин, этилендиаминтетраацетат, полистироловые плашки (Россия), фотометр-анализатор иммуноферментный Humareader, “Human” (Германия).

Статистическую обработку полученных данных проводили методом Стьюдента-Фишера с использованием программного обеспечения Excel.

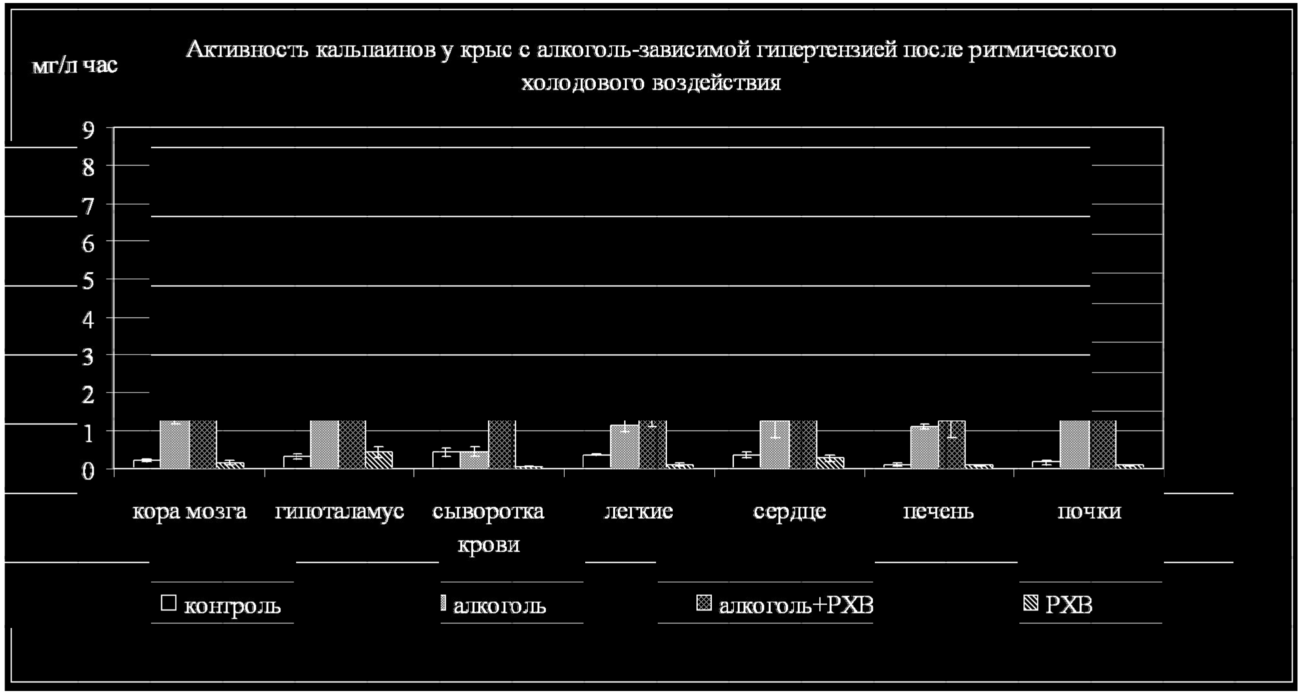
**Результаты и обсуждение.** Уровень систолического артериального давления у алкоголизированных крыс составил 176,70±20,68 мм рт.ст. против 130,00±12,25 мм рт.ст. в контроле, что указывает на формирование гипертензии, в результате проведения РХВ при АЗГ - 125,0±10,5 мм рт.ст., в группе сравнения (РХВ) - 127,00±13,35 мм рт.ст.

Выявлено, что активность кальпаинов при АЗГ существенно повышается во всех тканях, в сыворотке крови изменения отсутствуют (рис.). После РХВ у крыс с АЗГ активность кальпаинов увеличивалась более выражено в сыворотке крови (примерно в 8 раз по сравнению с АЗГ), менее - в сердце, КМ и почках (примерно в 5, 4 и 2 раз по сравнению с АЗГ, соответственно). Действие РХВ на интактных животных не приводило к изменениям активности кальпаинов, обнаружено ее снижение в сыворотке крови и легких.

Активация кальпаинов при АЗГ в тканях при отсутствии изменений в сыворотке крови может быть обусловлена внутриклеточной локализацией кальпаинов (Cai Y. et al., 2012, Sorimachi H, Ono Y., 2012). Такая активация может приводить к реорганизации цитоскелета, деградации протеинов, ускорению процессов старения и др. При этом патологическое сужение сосудов значительно увеличивает локальную активность кальпаинов, что опосредовано участием рецепторов ангиотензина II 1-го типа (AT1) (Scalia R. et al., 2011). Активация кальпаинов в сосудах вызывает дисфункцию эндотелия с повышением взаимодействия лейкоцитов с эндотелием и проницаемости альбумина. Через AT1-сигнализацию преимущественно активируются изоформы μ-кальпаинов и кальпаин-зависимая деградация ядерного фактора IκBα. Указанные физиологические и биохимические показатели могут нормализоваться в естественных условиях последующим торможением AT1-рецепторов или кальпаинов.

Следует отметить, что кальпаины распространены во всех тканях мозга и изменение их активности способствует и нормальной, и аномальной его функции (Duffy K.R, Duffy M.S., 2011), в том числе - при старении и развитии болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, когда могут происходить нарушения протеинового обмена в мембранах нейронов через кальций-зависимый механизм и/или повышение кальций-чувствительного протеолиза (Goll D.E. et al., 2003, Cai Y. et al., 2012). Повреждению нейронов может способствовать также токсичность избыточного поступления Ca(2+), необходимого для функционирования кальпаинов (D'Orsi B. et al., 2012). Кальпаины могут протеолитически разрушать спектрины - протеины внутриклеточной поверхности плазмалеммы, которые играют важную роль в поддержании стабильности и пластичности цитоскелета (Cai Y. et al., 2012). В результате образуются продукты распада α-спектрина, которые являются предполагаемыми биомаркерами черепно-мозговой травмы, и их содержание увеличивается в мозге при старении, болезни Альцгеймера. Можно предполагать, что при АЗГ у крыс развиваются процессы преждевременного старения мозга и патологические изменения.

Отмеченные изменения активности кальпаинов за исключением таковых в ткани легких согласуются с представленными ранее результатами (Самохіна Л.М., Ломако В.В., 2011). Отличие в локальной активности кальпаинов может быть обусловлено функциональными свойствами


Активность кальпаинов у крыс с алкоголь-зависимой гипертензией после ритмического
холодового воздействия
мг/л час
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
кора мозга
гипоталамус
сыворотка крови
легкие
сердце
печень
почки
контроль
алкоголь
алкоголь+РХВ
РХВ

данного органа, в частности механическая вентиляция легких с высоким дыхательным объемом индуцирует быструю (в течение нескольких минут) и стойкую активацию кальпаинов и воспаление легких, обусловленное выбросом нейтрофилов, высвобождением фактора некроза опухолей α и интерлейкина 6, увеличением проницаемости сосудов легких и формированием отека (Liu D. et al., 2012). При этом кальпаины опосредуют активацию раннего воспаления легких через NO-синтаза/NO-зависимое фосфорилирование внутриклеточных молекул адгезии 1 и выброс нейтрофилов. Со временем происходит исчерпание возможностей активации кальпаинов, наблюдается отсутствие их синтеза (Самохіна Л.М., Ломако В.В., 2011). Известно также, что кальпаин-связанные патологии приводят к увеличению внутриклеточной концентрации Ca(2+) (Goll D.E. et al., 2003). Но это увеличение не является достаточным для поддержания активности кальпаинов непосредственно, таким образом происходит ее снижение.

Кальпаины способны защищать сердце от гемодинамических нагрузок, а именно повышения давления (Taneike M. et al., 2011). При этом кроме кальпаинов 1 и 2, μ- и m- кальпаинов, соответственно, выделяют роль регуляторного кальпаина 4. У кальпаин 4-дефицитных мышей при гемодинамическом стрессе отмечается снижение уровня кальпаинов 1 и 2, интерстициальный фиброз после перегрузки давлением, разрушение плазматических мембран в сердце, расширение левого желудочка, сократительная дисфункция.

Повышение активности кальпаинов в сердце может приводить к гипертонии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (Taneike M. et al., 2011, Letavernier E. et al., 2012). Основным механизмом прогрессирования последней при различных патологиях, включая гипертонию, кардиомиопатии и инфаркт миокарда, считают ремоделирование сердца за счет геометрических и структурных изменений (Mueller A.L., Dhalla N.S. et al., 2012). К такому эффекту может приводить увеличение активности кальпаинов наряду с другими протеолитическими энзимами: матриксными металлопротеиназами, катепсинами, каспазами. При этом считают, что матриксные металлопротеиназы и катепсины влияют на изменения внеклеточных структур, функционирование субклеточных органелл в тканях сердца, а активация каспаз, кальпаинов стимулирует субклеточные реконструкции вне сердца. Известно также, что в кардиомиоцитах кальпаин 1 активирует каспазу 3 во время апоптоза, индуцированного фактором некроза опухолей α, а также расщепляет апоптоз-индуцирующий фактор после Ca(2+)-перегрузки (Smith M.A., Schnellmann R.G., 2012). В процессах ремоделирования миокарда кальпаины могут влиять на передачу сигналов, способствовать развитию гипертрофии и воспаления в результате активации факторов транскрипции, таких как ядерный фактор kB (Letavernier E. et al., 2012). Активация кальпаинов приводит к усилению патологических изменений, повышению скорости деградации протеинов (Chaudhary P. et al., 2012, Sorimachi H, Ono Y., 2012).

Активация кальпаинов в печени при АЗГ может быть обусловлена интоксикацией. Влияние экзогенных и эндогенных факторов, вызывающих гибель клеток через активацию кальпаинов, может изменять пролиферативные индексы в клетках печени (Arnal N. et al., 2012).

В клетках почек кальпаины 1 и 2 стимулируют апоптоз и некроз путем расщепления протеинов цитоскелета, что увеличивает проницаемость мембран (Smith M.A., Schnellmann R.G., 2012). Под действием хемотаксических пептидов и других стимуляторов кальпаины способны принимать участие в активации нейтрофилов, это может способствовать развитию тканевого повреждения, обусловленного наличием систем, генерирующих супероксид-анион и гидролитические ферменты. Активность кальпаинов может способствовать увеличению протеинурии, подавлению экспрессию нефрина, формированию гломерулярного повреждения (Самохіна Л.М. та інш., 2008).

Увеличение активности кальпаинов после РХВ у крыс с АЗГ в сыворотке крови, сердце, КМ и почках согласуется с данными, полученными ранее, и указывает на стимулирующий эффект РХВ, проявляющийся в активации энзимов у крыс со стресс-стимулированной гипертензией (Самохина Л.М., 2003). Довольно значимая активация может быть следствием явления гормезиса, вызванного кратковременными воздействиями низких температур (Баранов А.Ю., 1999). При этом РХВ выступает в роли стимулятора, так как температура воздействия имеет ритмический характер 0,1 Гц и значительно меньше вредного для организма уровня (Марченко В.С. и др., 1995). В основе таких изменений может лежать усиление утилизации недоокисленных продуктов, модуляция активности антиоксидантних энзимов под новые функциональные потребности (Єлісєєва О.П., Рибальченко В.К., 2012). При этом низкая интенсивность окислительно-восстановительных реакций коррелирует со снижением вариабельности сердечного ритма и является причиной персистенции окислительного стресса, преградой индукции и длительной поддержки реакции активации. Умеренная, контролированная, адекватная относительно функциональных резервов активация аэробного метаболизма способствует интенсивным флуктуациям эндогенного кислорода, его использованию для поддержания баланса продукция/утилизация АФК, кислородного гомеостаза, что оптимизирует функцию кардиореспираторной системы и предупреждает ее чрезмерное напряжение в условиях целенаправленного формирования адаптационных процессов, способствующих повышению устойчивости организма к окислительному стрессу.

Увеличение активности кальпаинов в сердце в группе АЗГ+РХВ может быть также связано с функционированием мышечной ткани, снижением силы сокращений. Мышцы, которые растягиваются во время сокращения (эксцентрические сокращения), характеризуются дефицитом силы и различными структурными изменениями, в том числе потерей протеинов цитоскелета (Zhang B.T. et al., 2012). После эксцентрических сокращений снижается жесткость мышц. При этом отмечают роль поступления внеклеточного Ca(2+) и активации кальпаинов в клетках. μ-Кальпаины активируются уже через 30 мин после 10 эксцентрических сокращений с появлением продуктов аутолиза, имеющих низкую молекулярную массу. Таким образом, потеря протеинов цитоскелета за счет активации кальпаинов может приводить к снижению жесткости мышечной ткани сердца в группе АЗГ+РХВ.

Значительное увеличение уровня кальпаинов в КМ у крыс с АЗГ+РХВ может быть обусловлено эффектами РХВ на ультраструктуру астроцитов, особенно их отростков, которые окружают терминальные сосуды, регулирующие кровоток в капиллярной сети (Марченко В.С. и др., 1995).

Увеличение активности кальпаинов в почках в группе АЗГ+РХВ может быть обусловлено функционированием данного органа, связанной с усиленной экскрецией метаболитов и токсинов из организма. Кровь через систему внутрипочечных кровеносных сосудов поступает в фильтрующий аппарат почки – сложную капиллярную сеть, упакованную в виде клубочков (гломерул). Все, что не нужно организму или содержится в крови в избыточном количестве, остается в моче и выводится с ней. Поэтому повышение активности кальпаинов в почках менее выраженное в группе АЗГ+РХВ, т.к. только часть кальпаинов в системе почечных канальцев всасывается и поступает обратно в кровь.

Отсутствие достоверных изменений в группе АЗГ+РХВ в печени, гипоталамусе по сравнению с АЗГ может быть обусловлено тем, что поступление $Ca^{2+}$ в клетку по градиенту концентрации уравновешивается его активным выведением, осуществляемым при участии $Ca^{2+}$-транспортной АТФазы в печени и $Na^{+}/Ca^{2+}$ обменом в возбудимых тканях (Куценко С.А., 2002).

В легких отсутствие достоверных изменений в группе АЗГ+РХВ по сравнению с АЗГ скорее всего связано с эффектом РХВ, который проявляется в снижении активности кальпаинов у интактных животных за счет возможного окисления цистеина в их активном центре. Этот эффект может быть обусловлен непосредственным влиянием вдыхаемого холодного воздуха на ткани легких.

Низкая активность кальпаинов у интактных крыс после РХВ в сыворотке крови может быть обусловлена участием кальпаинов в физиологической гибели клеток, регуляции апоптоза через активацию проапоптогенных факторов и деградацию антиапоптогенных протеинов (Raam B.J. et al., 2008). При этом спонтанный апоптоз клеток связан с градуальным увеличением внутриклеточного Ca(2+). Низкая активность кальпаинов ассоциируется с уменьшением концентрации свободного Ca(2+) и снижением апоптоза.

**Выводы.** Активность кальпаинов при АЗГ у крыс повышена в тканях мозга и внутренних органов и после РХВ не восстанавливается до уровня контроля, а наоборот возрастает, при этом наиболее существенно - в сыворотке крови, что может быть обусловлено высвобождением кальпаинов из клеток.

Активность кальпаинов после РХВ у крыс с АЗГ достоверно повышается в сердце, КМ и почках, указывая на стимулирующий эффект РХВ, связанный скорее всего с усилением утилизации недоокисленных продуктов, со снижением жесткости мышечной ткани сердца, изменением ультраструктуры отростков астроцитов, окружающих терминальные сосуды, регулирующие кровоток в капиллярной сети.

Эффекты РХВ в норме отличаются от таковых при АЗГ и заключаются в снижении активности кальпаинов в сыворотке крови и легких, что может быть обусловлено уменьшением концентрации свободного Ca(2+), снижением апоптоза клеток, окислением цистеина в активном центре, нарушением функционирования мышц и эффективности использования кислорода.

Перспективным является изучение взаимосвязи изменений морфофункциональных показателей и активности кальпаинов в тканях крыс с АЗГ после РХВ и определение более эффективных режимов воздействия для обеспечения нормального функционирования организма.

**Литература**

1. Баранов А.Ю. Лечение холодом. Криомедицина. СПб: Атон, 1999. 272 с.

2. Єлісєєва О.П., Рибальченко В.К. // Тезисы докладов Научно-практической конференции “Адаптационные стратегии живых систем», Новый Свет, Украина, Киев, 2012. С. 39.

3. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб: Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 2002. 395 с.

4. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др. // Проблемы криобиологии. 1995. № 3. С. 10-19.

5. Пат. 1655991 РФ, МКИ G 01 N 33/48, C 12 Q 1/38. Способ определения активности протеиназ или их ингибиторов в биологических жидкостях / Самохина Л.М., Дубинин А.А. Заявка №4654144; Заявл. 22.02.89.

6. Самохіна Л.М., Ломако В.В. // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Серия біологія. 2011. Том 13, Вып. 947. С.23–28.

7. Самохина Л.М. // Проблемы криобиологии. 2003. № 1. С.20-25.

8. Самохіна Л.М., Топчій І.І., Несен А.О. // Укр. журнал нефрології та діалізу. 2008. Т. 17, № 1. С. 33-37.

9. Arnal N., de Alaniz M.J., Marra C.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1820, № 7. P. 931-939.

10. Cai Y., Zhu H.X., Li J.M. et al. // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 6.P. e37599.

11. Chaudhary P., Suryakumar G., Prasad R. et al. // Mol. Cell. Biochem. 2012. Vol. 364, № 1-2. P. 101-113.

12. D'Orsi B., Bonner H., Tuffy L.P. et al. // J. Neurosci. 2012. Vol. 32, № 5. P.1847-1858.

13. Duffy K.R, Duffy M.S. // J.Neurosci. Methods. 2011. Vol. 201, № 2. P. 333-339.

14. Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al. // Physiol Rev. 2003. Vol. 83, № 3. P.731-801.

15. Letavernier E., Zafrani L., Perez J. et al. // Cardiovasc. Res. 2012. Vol. 96, № 1. P. 38-45.

16. Liu D., Yan Z., Minshall R.D. et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2012. Vol. 302, № 4. P. 370-379.

17. Mueller A.L., Dhalla N.S. // Heart Fail. Rev. 2012. Vol. 17, № 3. P. 395-409.

18. Raam B.J., Drewniak A., Groenewold V. et al. // Blood. 2008. Vol. 112, № 5. P. 2046–2054.

19. Samantaray S., Patel K.S., Knaryan V.H. et al. // Neurochem. Res. 2013. Vol. 3, № 8. P.1734-1741.

20. Scalia R., Gong Y., Berzins B., et al. // Circ. Res. 201. Vol. 108, № 9. P. 1102-1111.

21. Smith M.A., Schnellmann R.G. // Cardiovasc. Res. 2012. Vol. 96, № 1. P. 32-37.

22. Sorimachi H, Ono Y. // Cardiovasc. Res. 2012. Vol. 96, № 1. P.11-22.

23. Taneike M., Mizote I., Morita T. et al. // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 37. P. 32170-32177.

24. Zalewska T., Domanska-Janik K. // Praze z Biologii molekularney. 1990. Vol. 986, № 19. P. 103-115.

25. Zhang B.T., Whitehead N.P., Gervasio O.L. et al. // J. Appl. Physiol. 2012. Vol. 112, № 12. P. 2077-2086.

# ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ МУТНЕРОВСКИХ НЕЙРОНОВ РЫБ *PERCCOTTUS GLEHNI* ПРИ ГИБЕРНАЦИИ

**Санталова И.М., Каранова М.В., Коканова Н.А., Мошков Д.А.**
*ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*
*Пущино, Моск.обл., Россия*
E-mail: cima@rambler.ru

Выяснение функциональных и морфологических изменений, регулирующих адаптацию живых организмов к переживанию неблагоприятных условий, в частности, к холоду и отсутствию пищи в течение продолжительного периода, является актуальным направлением в современной биологии и медицине. В этом плане рыбы представляют собой интересный объект изучения. Например, ротан, *Perccottus glehni*, представитель пресноводных пойкилотермных гидробионтов, подвергающихся значительным колебаниям температуры от околонулевых значений зимой до 30° и выше летом. Сигналом для начала зимовки обычно служит падение температуры ниже определенной величины. Полагают, что изменение интенсивности световых лучей также стимулирует организм рыбы на изменение биологических ритмов в соответствии с сезоном. Переход в состояние оцепенения характеризуется снижением активности, полным прекращением или резким снижением потребления пищи, падением интенсивности обмена веществ и поддержанием его за счет накопленных в организме энергетических ресурсов. Производя сравнительно мало эндогенного тепла и обладая лишь отдельными терморегуляторными реакциями, пойкилотермные животные, и в том числе ротаны, не могут обеспечить постоянство теплообмена в организме, поэтому при снижении температуры зимой их активность прерывается. При этом сохраняются все механизмы, обеспечивающие возврат животного к последующей активной жизнедеятельности. В литературе имеются данные о значительных биохимических сдвигах, наблюдаемых в клетках разных тканей рыб и, в частности, ротанов *P. glehni* (Каранова М.В., 2013). Нам представилось интересным проследить за структурными изменениями в нейронах этих рыб в разные физиологические периоды, сопоставимые со временем биохимических исследований, а именно в активный летний период (1 серия), в начале зимнего оцепенения (2 серия) и в момент его завершения (3 серия). В качестве исследуемых были выбраны маутнеровские нейроны (МН), расположенные в продолговатом мозге рыб, парные гигантские нервные клетки, обладающие множеством афферентных входов, располагающихся на поверхности сомы и двух дендритах – латеральном и вентральном. Каждый МН является собственно командным нейроном, управляющим специфическим поведением животных – реакцией избегания (Мошков Д.А., 1985; Preuss, Faber, 2003).

Рыб 1 серии, выловленных в июле в озере Тульчино Московской области сразу брали в эксперимент. Рыб 2 и 3 серии, выловленных в начале зимы, помещали в 5 литровых сосудах в холодильную камеру с температурой около –1°С. На 2-3й день вода в сосудах промерзала наполовину. Рыбы содержались в условиях максимально приближенных к естественным: в пресной холодной воде, в темноте, без пищи и с ограниченным доступом кислорода. В момент эксперимента рыб доставали и декапитировали на льду. Под бинокуляром выделяли участок продолговатого мозга, содержащий МН и фиксировали в растворе 4% формальдегида и 2,5% глутаральдегида. Через 12 часов образцы дофиксировали в 2 % растворе четырехокиси осмия, обезвоживали и заключали в эпон. Полученные блоки резали фронтально на пирамитоме LKB (Швеция) для получения серии последовательных срезов толщиной 3 мкм. Срезы, на которых были идентифицированы МН, фотографировали по частям, получая не менее 20 изображений. При этом каждое изображение перекрывалось с соседним участком, что необходимо для получения оптимальной панорамы отдельного среза. Трёхмерные изображения объектов получали с помощью программы IGL Trace, количественные данные получали в программе 3D View 3.5. (Михайлова Г.З., 2013).

Анализ реконструированных срезов МН рыб 1 и 2 серии не выявил заметных различий в нейронах и их отростках в условиях летнего и раннезимнего периода (подготовка к зимней спячке). Размеры и пространственное расположение сомы, обоих дендритов и аксонов достаточно однородны. Это может свидетельствовать о том, что в данный период времени нейроны активны и в них идет активный метаболизм, что подтверждается данными биохимических исследований (Каранова М.В., 2013). Совсем другое состояние МН обнаруживается к моменту завершения периода зимовки у рыб 3 серии. Общий размер их нейронов - соматической части и обоих дендритов уменьшаются на 30-40%. Особенно ощутимо изменяются размеры вентрального дендрита - на 80%, он сильно укорачивается и истончается. Эти данные свидетельствуют о явном снижении функциональной активности МН. Известно, что МН получают афферентные окончания, по крайней мере, от двух важнейших анализаторов: статоакустического и зрительного, и, что очень важно, афферентные входы от этих анализаторов строго сегрегированны. Статоакустический вход покрывает всю поверхность латерального дендрита, а также сомы. Зрительный вход располагается на поверхности вентрального дендрита (Szabo T.M., McCormick C.A., Faber D.S., 2007). Можно предположить, что в зимний период функция зрения рыб из-за низкой освещенности становится не актуальной, т.к. через лед толщиной в 40 см приникает всего 5-10% световых лучей, вследствие этого вентральные дендриты оказываются в состоянии естественной депривации. Вероятно, в условиях сильно ограниченной видимости отпадает необходимость поддерживать в активном состоянии весь вентральный дендрит и поэтому его размеры сильно редуцируются, что, несомненно, выгодно, учитывая необходимость экономии энергетических резервов организма. Таким образом, полученные морфологические данные могли бы свидетельствовать о снижении функциональной активности МН в период гибернации. Однако такое заключение противоречит известному факту, что МН при любых обстоятельствах выполняют сторожевую роль и обеспечивают выполнение «реакции страха», направленной на избегание возможной опасности (Мошков Д.А., 1985; Preuss, Faber, 2003). Как показано в предыдущих наших работах, выполненных в условиях нормальной температуры внешней среды, вызванное в эксперименте уменьшение размеров вентральных дендритов (искусственная энуклеация глаз или длительная естественная стимуляция зрительного входа) не приводит к подавлению функциональной активности нейронов, наоборот, ее стимулирует (Moshkov D.A.et al., 2009). Исходя из этого, можно предположить, что выявленное при гибернации морфологическое изменение размеров вентральных дендритов является признаком усиления функциональной активности МН, во всяком случае, их возросшей чувствительности к зрительным сигналам. Кроме того, несомненно, присутствуют и другие компенсаторные механизмы, связанные с повышением активности других анализаторов, в том числе, возможно, кожных терморецепторов. Так, установлено, что у многих рыб кожные терморецепторы повышают свою активность при понижении температуры (Сравнительная физиология животных, 1977). Вероятно, таким образом, при редукции нейрональных зрительных систем в зимний период обеспечивается достаточная функциональная активность МН, необходимая для успешного выполнения ими своей сторожевой функции.

Схожие пластические изменения в структуре нейронов зимоспящих млекопитающих, находящихся в состоянии гибернации, были обнаружены еще в начале 90-х годов. На нейронах гиппокампа сусликов было показано, что размеры тел нервных клеток и степень ветвления их дендритов уменьшаются (Popov V.I., Bocharova L.S., Bragin A.G. 1992). В дальнейшем было установлено наличие подобных морфологических изменений и в других отделах мозга: в коре и таламусе. Однако мозг млекопитающих очень сложен и состоит из огромного числа клеток, поэтому при изменении условий жизнедеятельности невозможно однозначно проследить за структурными превращениями отдельного нейрона. Рыбы для подобных исследований являются более удачной моделью. Использование в качестве маркеров нейронов Маутнера дает возможность вплотную подойти к выяснению механизмов компенсаторных обменов и перераспределения функций при понижении чувствительности одной части с повышением чувствительности другой части в единой нервной системе.

*Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ № 12-04-00699а.*

**Литература**

1. Каранова М.В. // Журн. Эвол. Биохим. и Физиол. 2013. Т. 49. № 3. С. 195-202.

2. Мошков Д.А. Адаптация и ультраструктура нейрона. М.: Наука, 1985. 200с.

3. Preuss T., Faber D.S. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 13. P. 5617-5626.

4. Михайлова Г.З., Коканова Н.А., Тирас Н.Р., Мошков Д.А.Трехмерная реконструкция и определение объема нейрона. М.: Либроком, 2012. 80 с.

5. Szabo T.M., McCormick C.A., Faber D.S. // J. Comp. Neurol. 2007 V.505. № 5. P. 511-525.

6. Moshkov D.A. ,Mikhailova G.Z., Stanchaev R.S.// J. Integr. Neuroscience. 2009. V. 8. № 4. C. 441-451.

7. Сравнительная физиология животных (под ред. Т.М.Турпаева). М.: Мир, 1977). Том 2, 570с.

8. Popov V.I., Bocharova L.S., Bragin A.G. // Neuroscience. 1992.V. 48. № 1 P. 45-51.

## ВЛИЯНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ

**Черкашина Д.В., Сосимчик И.А., Семенченко О.А.**

*ИПКиК НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: daria_cherkashina@ukr.net

Изолированные гепатоциты в настоящее время широко используются как в научных исследованиях, так и в клинической практике (Nibourg G.A. et al., 2012), в связи с чем не теряет своей актуальности проблема поиска эффективных методов их длительного хранения без потери функциональной активности. Одним из таких подходов является гипотермическое хранение (ГХ) гепатоцитов, однако, его безопасная продолжительность в стандартных условиях не превышает 3-х суток, после чего в клетках наблюдаются необратимые метаболические нарушения (Кравченко Л.П. и др., 2001). В связи с этим поиск компонентов для сред ГХ, которые обеспечивали бы эффективную защиту клеток от повреждений, остаётся открытым. Наше внимание привлекли биологически активные вещества, продуцируемые мезенхимальными стромальными клетками (МСК) различного происхождения, которые способны модулировать метаболическую, иммунологическую и другие активности разных типов клеток (Parekkadan B. et al., 2007). Существует ряд работ, подтверждающих положительный эффект смеси трофических факторов на состояние клеток и целых органов после ГХ (Ambiru S. et al., 2004; McAnulty J.F. et al., 2002; Kwon Y.S. et al., 2007). Таким образом, целью нашей работы явилось исследование влияния биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток (БСПК) в составе так называемых «кондиционных сред» (КС) на сохранность и метаболическую активность гепатоцитов после долгосрочного ГХ.

Для выполнения работы использовали белых беспородных крыс массой 200-250 г (n=7), которых содержали в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Исследования проводили согласно требованиям Этического комитета Института, законодательству Украины и положениям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, Франция, 1986). Все манипуляции с животными выполняли под легким эфирным наркозом. В работе использовали гепатоциты крыс, полученные неферментативным методом (Kravchenko L.P. et al., 2002).

Жизнеспособность изолированных клеток оценивали традиционным способом – по окрашиванию витальным красителем трипановым синим. В качестве среды для ГХ изолированных гепатоцитов использовался сахарозо-солевой раствор (ССР), разработанный в ИПКиК НАН Украины (Petrenko A.Yu. et al., 2010).

В качестве источника БСПК использовали КС, полученные при культивировании МСК дермы человека. Получение МСК дермы проводили с письменного согласия проинформированных доноров в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации по проведению биомедицинских исследований. Стромальные клетки культивировали в среде alpha-MEM, дополненной 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия), 2 мМ L-глутамина, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Температура составляла 37°C, влажность – 95 % влажности, концентрация $CO_2$ – 5 %. Продолжительность культивирования составляла 5-7 пассажей, смена среды осуществлялась 2 раза в неделю. Для получения КС клетки переводили на

24 ч в среду культивирования, не содержащую эмбриональную сыворотку, затем КС собирали и концентрировали при помощи селективных фильтров с минимальным отсекаемым объемом 3 кДа Amicon® Ultra-4, 3,000 NMWL (Merck-Millipore, Германия). Среды стандартизировали по общему содержанию белка, который определяли по методу Лоури в модификации Миллера.

Для проведения экспериментов были сформированы следующие группы: контрольная – свежеизолированные гепатоциты, ССР-группа и опытные группы с добавкой КС в дозе 10-40 мкг белка/мл ССР. Изолированные гепатоциты хранили в течение 24, 48 и 72 ч при температуре 0-4$^{o}$C в условиях бытового холодильника. Метаболическую активность гепатоцитов оценивали по степени восстановления редокс-индикатора Alamar Blue (AB) на спектрофлуориметре Tecan GENios (Австрия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Базальный уровень ТБК-активных продуктов определяли общепринятым методом (Арутюнян А.В., 2007). Полученные результаты обрабатывали статистически при помощи пакета программ “Statistica v.5.5” и “Excel 2007”. Данные оценивали, используя непараметрический критерий Манна-Уитни, выражали в виде M±m. Достоверно отличными считали результаты при $p<0{,}05$.

В ходе оценки сохранности гепатоцитов была отмечена зависимость между сроком ГХ клеток и их жизнеспособностью. Исходная жизнеспособность клеток составляла 88,5%. Как в контрольной группе, так и при внесении в консервирующий раствор БСПК, независимо от концентрации, жизнеспособность гепатоцитов снижалась при увеличении срока ГХ. Подобная тенденция наблюдалась до 48 ч ГХ. Тем не менее, на последнем, критическом этапе экспериментов, было установлено, что уровень жизнеспособности достоверно повышается в присутствии КС по сравнению с ССР-группой, в которой этот показатель составлял 53%. Наиболее выраженный эффект был выявлен в случае внесения в среду хранения КС в дозе 10 мкг/мл, где жизнеспособность гепатоцитов достигала 70%.

Важнейшим критерием при оценке степени повреждения гепатоцитов после ГХ является нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса, основной составляющей которого является общее содержание вторичных продуктов ПОЛ. Было показано, что в контрольной группе базальный уровень ТБК-активных продуктов в контрольной группе составлял 1,31±0,04 нмоль МДА/млн клеток. Увеличение срока ГХ приводило к постепенному повышению данного показателя, после 72 ч холодового хранения он превышал исходный уровень в 10 раз (13, 82±0,41 нмоль МДА/млн клеток).

При внесении в консервирующий раствор КС в различных дозах, базальный уровень ТБК-активных продуктов при увеличении срока ГХ повышался со скоростью, сравнимой с контрольной группой. Но после 72 ч ГХ уровень ТБК-активных продуктах достоверно понижался во всех БСПК-группах по сравнению с контролем, особенно выражены эти изменения были в случае добавки КС в дозе 40 мкг/мл, когда уровень ТБК-активных продуктов уменьшался в 3 раза. Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии БСПК на динамику накопления ТБК-активных продуктов в гепатоцитах после длительного ГХ, что частично коррелирует с показателями жизнеспособности клеток.

Для оценки метаболической активности гепатоцитов использовали тест, основанный на восстановлении флуоресцентного красителя, известного под коммерческим названием AlamarBlue™ (AB). AB – это редокс-индикатор, который быстро проникает через биологические мембраны и легко восстанавливается внутриклеточными ферментами. Известно, что степень восстановления AB пропорциональна активности окислительно-восстановительных ферментов, т.е. отражает метаболическую активность клеток.

Установлено, что дополнение консервирующего раствора КС в различных дозах не влияло на скорость восстановления AB после 24 ч ГХ гепатоцитов. При этом интенсивность флуоресценции AB достоверно понижалась во всех группах по сравнению с ССР-группой после 48 ч ГХ. После 72 ч ГХ степень восстановления AB достоверно повышалась в случае дополнения консервирующего раствора КС в дозе 10 мг белка/мл.

Таким образом, по совокупности полученных данных наиболее выраженное положительное влияние на метаболические процессы биорегуляторы оказывали после долгосрочного ГХ гепатоцитов в среде с добавкой КС в дозе 10 мкг белка/мл.

Для более детального понимания механизмов реализации эффектов БСПК были проведены эксперименты, которые сопровождались дополнительной нагрузкой изолированных гепатоцитов стрессорными агентами или эссенциальными метаболитами. Так, особую роль в регуляции клеточной активности играет перекись водорода. Это связано с тем, что $H_2O_2$ относительно стабильно генерируется клетками как побочный продукт метаболизма и легко проникает через биологические мембраны, что позволяет ей участвовать как во внутриклеточной, так и межклеточной сигнализации. Внутриклеточная концентрация $H_2O_2$ выше 1 мкМ токсична для клеток, при ней неизбежно повреждение большого числа. Концентрации $H_2O_2$, используемые клетками для регуляторных целей находятся в очень узком диапазоне. Поэтому была произведена оценка влияния БСПК на метаболизм изолированных гепатоцитов в присутствии перекиси (200 мМ $H_2O_2$).

В ходе этих экспериментов было установлено, что после 24 ч ГХ достоверных изменений в интенсивности флуоресценции АВ в опытных группах по сравнению с контрольной и ССР-группами не происходило. В свою очередь, после 48 и 72 ч ГХ были выявлены достоверные изменения степени восстановления АВ во всех опытных образцах, что может свидетельствовать о том, что БСПК, входящие в состав КС, способны положительно влиять на способность гепатоцитов сопротивляться экзогенному оксидативному стрессу после долгосрочного ГХ.

Восстановительные эквиваленты являются важнейшими участниками окислительно-восстановительных реакций, протекающих в клетке, к которым относится и работа электрон-транспортной цепи митохондрий и микросом, а также ряд биохимических реакций, протекающих в цитоплазме. Более того, известно, что сохранение пула восстановительных эквивалентов, в особенности системы НАДФ/НАДФН, является важнейшим фактором выживания клеток в условиях стресса и поддержания высокого уровня оксидорезистентности (Pandolfi P.P., 1995; Tian W.N., 1998). В связи с этим, было решено внести $НАДФ^+$ в качестве субстрата редокс-реакций в смесь, содержащую изолированные гепатоциты и КС. Установлено, что после 24, 48, а также 72 ч ГХ интенсивность флуоресценции АВ достоверно повышалась во всех опытных группах по сравнению с ССР-группой. Данный факт свидетельствует, что дополнение консервирующего раствора КС в различных концентрациях положительно влияет на способность изолированных гепатоцитов после ГХ использовать восстановительные эквиваленты, что, несомненно, позволяет повысить их метаболическую активность и общую резистентность к негативному влиянию гипоксии и низких температур.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы: 1) Внесение в консервирующий раствор БСПК в составе кондиционной среды, полученной после культивирования МСК дермы человека, положительно влияет на жизнеспособность изолированных гепатоцитов после 72 ч ГХ; 2) Дополнение сахарозо-содержащего раствора биорегуляторами приводит к значительному снижению базального уровня ТБК-активных продуктов в суспензии изолированных гепатоцитов после 72 ч холодового хранения; 3) Присутствие БСПК в дозе 10 мкг белка/мл в консервирующем растворе обеспечивает увеличение общей метаболической активности изолированных гепатоцитов после 72 ч ГХ., оцененной при помощи редокс-индикатора Alamar Blue; 4) Внесение БСПК в ССР повышает устойчивость к негативному действию перекиси водорода изолированных гепатоцитов после 48 и 72 ч ГХ, а также повышает их способность эффективно использовать восстановительные эквиваленты, что подтверждается повышением скорости утилизации $НАДФ^{+}$; 5) Наиболее значительный защитный эффект биорегуляторов наблюдается при продлении сроков хранения до 72 ч, что подтверждается повышением жизнеспособности изолированных гепатоцитов, снижением интенсивности процессов ПОЛ, а также более высокой метаболической активностью клеток.

**Литература**

1.Nibourg G.A., Chamuleau R.A., van Gulik T.M., Hoekstra R. Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: a review // Expert Opin Biol Ther. 2012. Vol. 12, № 7. P. 905–921.

2. Кравченко Л. П., Семенченко О.А., Фуллер Б.Д. Уровень АТФ в изолированных гепатоцитах на этапах холодового хранения в различных средах // Проблемы криобиологии. 2001. № 2. С. 56–60.

3. 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. 941.

4. 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.

5. 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.

6. Kwon Y. S., Folley J. D., Murphy C. J., McAnulty J.F. The effect of trophic factor supplementation on cold ischemia-induced early apoptotic changes // Transplantation. 2007. Vol. 83, № 1. P. 91–94.

7. Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Somov A.Yu., Fuller B.J. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yield of functional rat hepatocytes // Cell Biology International. 2002. 26, N11. P.1003-1006.

8. 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.

9. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Спб.: ИКС «Фолиант», 2000. 200с.

10. Pandolfi P.P., Sonati F., Rivi R. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD

is dispensable for pentose synthesis but essential for defence against oxidative stress // EMBOJ. 1995. Vol.14, № 21. P. 5209–5215.

11. Tian W.N., Braunstein L.D., Pang J. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // J.Biol.Chem. 1998. Vol.273, № 17. P.10609 -10617.

## ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ (–120°С) И КОРДОВОЙ КРОВИ НА СОСТОЯНИЕ ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА В ДИНАМИКЕ СТАРЕНИЯ КРЫС

**Чернявская Е.А., Бабийчук В.Г., Руднева Ю.В., Кулик В.В., Мамонтов В.В.**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина*

E-mail: elena_chernyavskaya@ukr.net

Как свидетельствуют древние рецепты, холод был одним из наиболее распространенных терапевтических приемов в медицине. Поиск эффективных немедикаментозных методов лечения различных заболеваний при помощи низких температур и сейчас остается в центре внимания ученых и медиков разных стран. В современной науке большой интерес вызывает исследование действия холода на организм человека и животных. Установлено (Бабийчук Г.А. и соавт., 1995), что холодовые воздействия синхронизируют активность ряда физиологических процессов в организме, синергизм которых приводит к активации реакций гомеостаза. Достижения науки в области криобиологии и криогеники, познание механизмов действия различных способов и режимов гипотермических и более низких температур на гомеостаз организма животных и человека предопределили перспективу и интерес практической медицины к активному поиску новых возможностей лечения холодом. По нашим наблюдениям (Марченко В.С., 2005; Бабийчук В.Г., 2006) непродолжительное действие низких температур на организм не опустошает энергетические и другие функциональные резервы организма, а, наоборот, активно влияя на вегетативную нервную систему (ВНС), повышают ее активность.

Структурно-функциональная организация ВНС определяет процесс интегрирования ряда функций организма, обеспечивая приспособительные реакции, направленные на повышение жизнеспособности. Ей принадлежит и важная роль контролировать возрастные изменения, в том числе и в ЦНС, которые становятся ведущим фактором в старении организма. Уже несколько десятилетий как обнаружена взаимосвязь между ВНС и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний, включая внезапную смерть.

Научные исследования последних лет подтверждают высокий потенциал применения в медицине кордовой крови, содержащей гемопоэтические стволовые клетки. В клинической практике накоплена значительная информация о положительном влиянии препаратов полученных из кордовой крови, как на разные органы, системы, клеточные культуры, так и на организм в целом (Cornetta K., 1995). Благодаря своему биохимическому составу кордовая кровь является уникальной субстанцией с разнонаправленной биологической активностью.

Одним из основных методов оценки текущего функционального состояния организма человека является спектральный анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР), который позволяет обнаружить периодические составляющие в колебаниях сердечного ритма и оценить их количественный вклад в динамику ритма. В настоящее время определение показателей ВСР признано наиболее информативным методом количественной оценки вегетативной регуляции сердечного ритма. Считается, что снижение показателей ВСР свидетельствует о нарушении вегетативного контроля сердечной деятельности и неблагоприятно для прогноза.

Учитывая уникальную способность ритмических экстремальных холодовых воздействий (РЭХВ) повышать проницаемость гематоэнцефалического барьера для нейромедиаторов, катехоламинов, белков плазмы, гормонов (Бабийчук В.Г., 2007) целью данного исследования являлось изучить действие РЭХВ (–120$^0$С) и криоконсервированного препарата ядросодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) на функциональное состояние вегетативной нервной системы в динамике старения крыс.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах в динамике их старения. Все животные были подразделены на три группы (по 7 крыс в каждой):

первая группа – 6 и 12 месячные контрольные (интактные) животные;

вторая группа – молодые половозрелые животные, возраст 6 месяцев, которым проводили 9 сеансов РЭХВ (–120°С) и вводили криоконсервированный препарат ЯСК КК;

третья группа – крысы, достигшие 12 месячного возраста после повторного ритмического экстремального охлаждения и введения препарата ЯСК КК.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (г.Киев, Украина, 2001 г.) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (г.Страсбург, Франция, 1986 г.). РЭХВ выполняли в криокамере для охлаждения экспериментальных животных (Бабийчук Г.А. и соавт., 2009 Пат. 40168 Україна). В криокамере (–120$^0$C) животные находились в течение 2 мин, затем их вынимали и содержали 5 мин при комнатной температуре (22…24 $^0$C) вне камеры. Далее процедуру охлаждения повторяли: животных согревали 5 мин при комнатной температуре, после чего по аналогичной схеме проводили цикл охлаждения. Таким образом, животные получали три процедуры РЭХВ в сутки. На 3 и 5-е сутки сеансы РЭХВ повторяли. Всего животные подвергались охлаждению 9 раз по 2 мин при температуре –120$^0$C.

Размороженный препарат ЯСК КК, содержащий гемопоэтические стволовые клетки с концентрацией стволовых $CD34^+$ клеток 2–4х$10^5$ в 1мл, вводили однократно, внутрибрюшинно в дозе 1х$10^5$ $CD34^+$ клеток на килограмм веса после шестой процедуры охлаждения. Препарат доводили до объема 1 мл плазмой. Повторный цикл охлаждения и введение препарата ЯСК КК экспериментальным животным проводили через 6 месяцев.

Регистрацию электрокардиограммы осуществляли после 3, 6, 9-го сеанса РЭХВ, а также на следующие сутки, через трое суток, неделю и месяц после последней процедуры охлаждения и введения ЯСК КК на электрокардиографе серии «Поли-Спектр» («Нейро-Софт», Россия) в шести стандартных отведениях. Длительность записи составляла 5 мин. Спектральный анализ ВСР проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм» (Россия). Согласно основной системе спектрального анализа (Воронин И.М. и соавт. 1999) нами были выделены и проанализированы следующие показатели:

TP, (мс$^2$)-полная мощность спектра колебаний кардиоритма;

HF, (мс$^2$)-мощность высокочастотных колебаний (0,15–0,4 Гц);

LF, (мс$^2$)- мощность низкочастотных колебаний (0,04–0,15Гц);

VLF, (мс$^2$)-мощность спектра кардиоритма в области очень низких частот (0,003–0,04Гц).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Установлено, что у 6 месячных крыс после 3, 6 сеанса РЭХВ и на следующие сутки после введения ЯСК КК, а также после 9 сеанса РЭХВ и через 3 суток после введения ЯСК КК (рис. 1) общая мощность спектра нейрогуморальной регуляции (TP) возрастала по отношению к контрольным показателям благодаря активации как симпатического и парасимпатического отделов ВНС, так и гуморального звена регуляции (увеличение удельного веса LF, HF и VLF волн).

Увеличение активности гуморальной регуляции (VLF-волны) можно объяснить гормональными влияниями на миокард, влияниями эндокринных и гуморальных факторов на синусовый узел, а также связью волн этой частоты с ритмами терморегуляции.

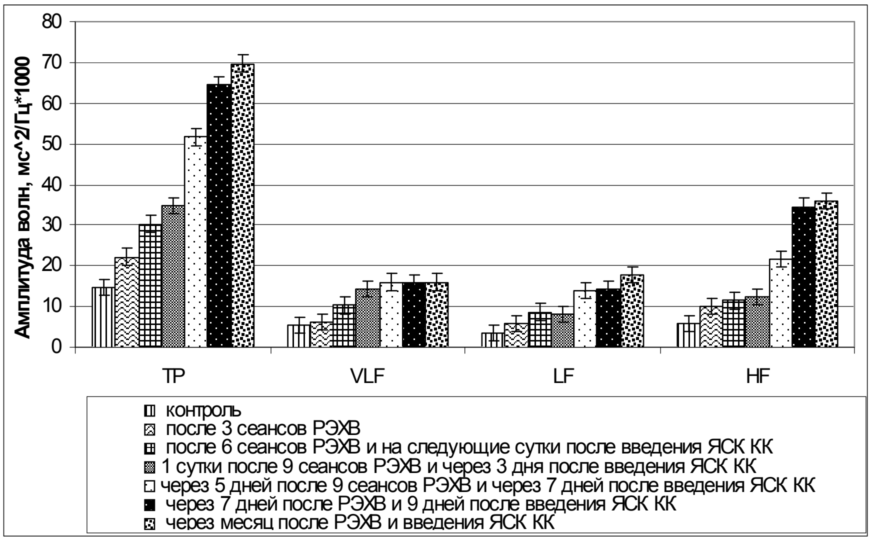



Рис. 1. Показатели спектрального анализа ВСР у 6 месячных крыс после РЭХВ и введения криоконсервированного препарата ЯСК КК.

После 9 процедуры РЭХВ и через 7 суток после введения ЯСК КК (рис. 1) нами отмечена тенденция к увеличению значений общей спектральной мощности по отношению к предыдущим этапам экспериментальных исследований преимущественно за счет повышения тонуса симпатического и парасимпатического отделов ВНС на фоне не меняющейся активности гуморальных систем регуляции.

Прослеживалась необходимость оценить показатели спектрального анализа ВСР у 6 месячных животных через неделю, а также через месяц после РЭХВ и введения ЯСК КК, по результатам которого можно опосредованно судить о состоянии регуляторных систем.

Интересно, что в отдаленные сроки наблюдения (рис. 1), существенно возрастали значения общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции в результате активации вегетативных центров, при этом уровень гуморальной регуляции не изменился по отношению к предыдущим срокам. В структуре ТР преобладал тонус парасимпатического отдела ВНС.

Положительным моментом, по нашему мнению, является тот факт, что подъем спектральной мощности был результатом активации деятельности вегетативных центров (повышение тонуса симпатического и парасимпатического отделов ВНС).

Таким образом, высокий уровень вагальных, симпатических влияний в модуляции сердечного ритма, свидетельствует о наличии у молодых крыс на фоне сочетанного применения РЭХВ и ЯСК КК развитой вегетативной регуляции.

Анализ волновой структуры сердечного ритма 12 месячных крыс после повторных 9 сеансов РЭХВ и введения криоконсервированного препарата ЯСК КК показал, что уже на фоне 3 процедур РЭХВ показатели общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции увеличивались относительно контрольных показателей, за счет активации симпатического и парасимпатического отдела ВНС. Уровень гуморальной регуляции соответствовал контролю. Этот факт дает возможность предположить, что РЭХВ, являясь звеном «мягкого, непродолжительного» стресса, активирует вегетативные центры, которые представляют самый высокий уровень автономной нервной системы, а она является наиболее развитым и быстрым путем реализации эффектов нейрогуморальной регуляции. Кроме того, вегетативные центры выполняют важную функцию вегетосоматической и вегетомотивационной интеграции.

После 6, 9 сеанса РЭХВ, через сутки и три дня после введения препарата ЯСК КК повышалась активность гуморального звена регуляции, а также ВНС.

Известно, что плазма кордовой крови содержит в своем составе большое количество биологически активных веществ, в том числе – гормоны, нейропептиды, цитокины, аминокислоты. Поскольку препарат кордовой крови представляет собой взвесь криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови, в том числе и стволовых CD34+ клеток в аутоплазме, это предположительно объясняет возможный механизм повышения функциональной активности гуморального звена регуляции у экспериментальных животных после введения препарата.

Достоверное увеличение общей спектральной мощности у 12 месячных крыс, как по отношению к контролю, так и предыдущим срокам нами отмечено в отдаленные сроки экспериментальных наблюдений (через месяц после последней процедуры охлаждения и введения криоконсервированного препарата ЯСК КК). Отмечается повышение функциональной активности всех звеньев регуляции, включая ВНС (LF, HF компонент).

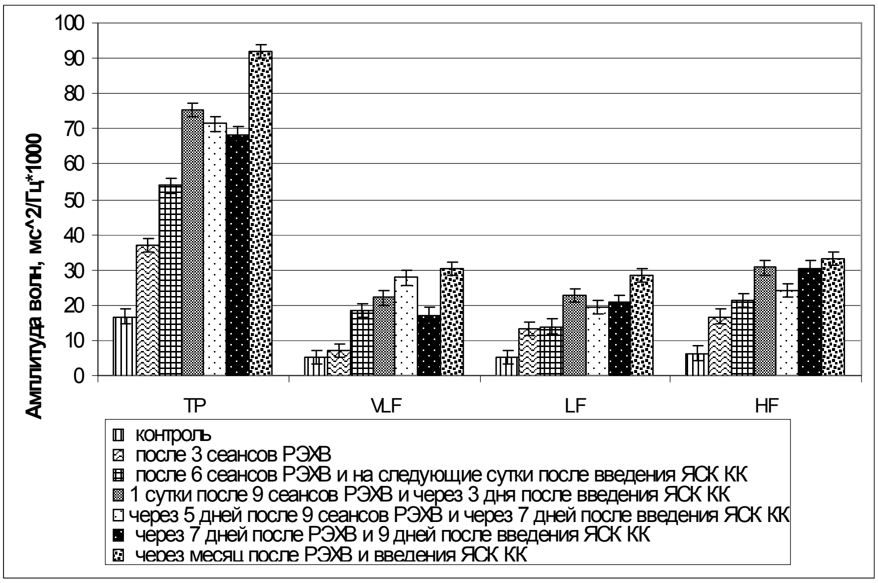



Рис. 2. Показатели спектрального анализа ВСР у 12 месячных крыс после повторных 9 процедур РЭХВ и введения криоконсервированного препарата ЯСК КК.

Таким образом, экспериментальные данные, полученные при исследовании ВСР у 6 и 12 месячных крыс на фоне РЭХВ и введения криоконсервированного препарата ЯСК КК, дают возможность предположить, что РЭХВ являются мощной физиотерапевтической процедурой, которая способна значительно повышать адаптационные возможности организма независимо от возраста. В тоже время, механизмы действия ЯСК КК, представляющей собой субстанцию с разнонаправленной биологической активностью направлены на активацию собственных гомеостатических регуляторных систем степень «изношенности» которых определяется индивидуальными особенностями. Подтверждением этому являются данные спектрального анализа ВСР, которые свидетельствуют о подъеме общей спектральной мощности не только за счет активации одного звена регуляции, а благодаря сбалансированному повышению активности всех звеньев регуляции.

По нашему мнению, терапевтические эффекты, которые наблюдаются при РЭХВ и введении криоконсервированного препарата ЯСК КК, могут быть связаны с тем, что организм реагирует на данные воздействия не только системой терморегуляции, но и всеми возможными адаптационными механизмами, включая гипоталамо-гипофизарно-адреналовую, иммунную и эндокринную системы. Эти изменения физиологически целесообразны, поскольку направлены на поддержание и коррекцию нарушенного гомеостаза.

**Литература**

1. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1.// Пробл. Криобиологии. 1995. №1. С.3-10.

2. Марченко В.С., Бабійчук Г.О., Марченко Л.М. До фрактальних механізмів структурно-функціонального стану центрів терморегуляції при гіпотермії і гібернації.// Пробл. Криобиологии . 2005. Т.15. №3. С. 503-508.

3. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности перекисного окисления липидов у крыс после экстремальных криовоздействий.// Пробл. Криобиологии. 2006. Т.16. №1. С. 32-44.

4. Cornetta K., Laughlin M., Carter S. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Tr ansplantation(COBLT) // Biol. Blood Marrow Transplant. 1995. Vol. 2, N 11. P.149–160.

5. Бабийчук В.Г. Сравнительная характеристика частоты сердечных сокращений у крыс при различных методах холодовых воздействий // Проблемы криобиологии. 2007. Т. 17, №3. С. 229–236.

6. Пат. 40168 Україна, МПК А61В 18/00. Кріокамера для експериментального охолодження лабораторних тварин/ Бабійчук Г.О., Козлов О.В., Ломакін І.І., Бабійчук В.Г.; власник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. u200812930; заявл. 06.11.2008; опубл. 25.03.2009. Бюл. №6.

7. Воронин И.М., Говша Ю.А., Истомина Т.А., Белов А.М. Вариабельность и спектральный анализ сердечного ритма в диагностике дисфункций синусового узла // Кардіологія. 1999. № 10. С. 32–34.

## КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КРОВИ СУСЛИКОВ ПРИ ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ И В ДИНАМИКЕ ПРОБУЖДЕНИЯ

**[1]Шихамирова З.М., [1]Джафарова А.М., [2]Гаджиева Ш.С., [1]Кличханов Н.К.**

*[1]ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», г. Махачкала, Россия*

*[2] Медико-санитарная часть МВД РД, г. Махачкала, Россия*

E-mail: klich-khan@mail.ru

Зимняя спячка млекопитающих является энергосберегающей стратегией, состоящей из периодов со значительным ингибированием метаболизма (1% от базального уровня), что приводит к существенному снижению частоты сердечных сокращений (около 6 ударов/мин), дыхания (около 5 дыхательных движений/мин) и температуры тела (отличается на несколько градусов от температуры окружающей среды) [Buck C.L., Barnes B.M., 2000]. Спячка у мелких грызунов протекает в виде последовательных циклов, баутов, прерываемых кратковременными пробуждениями, длящимися 8-24 ч., в течение которых метаболизм увеличивается, и температура тела быстро возвращается к эутермному уровню. Быстрый переход из торпидного состояния в бодрствующее при периодических пробуждениях животного приводит к серьезным изменениям в их физиологии, что может отражаться и на составе форменных элементов крови. В данной работе исследован состав форменных элементов крови и их количество в торпидном состоянии и в динамике индуцированного пробуждения. Опыты проведены на малых сусликах *Spermophlus pigmaeus Pall.* с массой тела животных 250-300 г. Исследованы 7 групп (по 4-6 особей в каждой) животных. Первую группу составляли бодрствующие в летний период животные (контроль), вторую – животные, находящиеся в состоянии глубокой зимней спячки, третью-седьмую – животные, находящиеся на различных этапах индуцированного пробуждения. Для индукции пробуждения после месяца спячки сусликов с температурой тела 2°C переносили в помещение с температурой 25°C. В течение 1,5 ч животные полностью пробуждались. Гематологические характеристики крови определяли на автоматическом анализаторе «Sismex KX-21 (Япония) и в мазках. При глубокой спячке достоверно возрастает (примерно на 20%) величина гематокрита, количество эритроцитов и содержание гемоглобина. Эти параметры остаются повышенными после пробуждения. В торпидном состоянии количество лейкоцитов в крови снижается в 3,4 раза по отношению к летнему контролю. Резкое снижение количества циркулирующих лейкоцитов в сочетании с уменьшением образования цитокинов макрофагами и лимфоцитами может серьезно повлиять на способность индуцировать эффективный иммунный ответ. В течение 1,5 ч после начала пробуждения количество лейкоцитов постепенно увеличивается до значений, характерных для летних эутермных животных. Возможно, наблюдаемое уменьшение лейкоцитов в торпидном состоянии обусловлено снижением их продукции при низкой температуре тела, а также относительно короткой продолжительностью жизни клеток. Во время пробуждения вновь образованные гранулоциты могут быстро поступать в кровь из костного мозга. Для получения более подробной информации о подтипах лейкоцитов, вовлеченных в торпор-обусловленную лейкопению, мы определяли количество гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов в крови сусликов при спячке и пробуждении. Оказалось, что лейкопения связана с изменением количества как гранулоцитов, так и моноцитов и лимфоцитов. На конечных стадиях пробуждения существенно возрастает в крови количество лимфоцитов (в 15 раз по сравнению с торпидным состоянием). В отличие от уменьшения числа циркулирующих гранулоцитов, лимфопения вряд ли связана с уменьшением скорости их образования, поскольку период полужизни лимфоцитов составляет несколько месяцев [Parretta E. et al., 2008]. Данные литературы указывают на то, что резкое снижение количества лимфоцитов в крови в торпидном состоянии не обусловлено их апоптозом в селезенке [Bouma H.R., 2010]. Снижение уровня лимфоцитов при спячке, видимо, связано с активацией молекул адгезии, увеличением сосудистой проницаемости и/или снижением освобождения их из вторичных лимфоидных органов. Количество тромбоцитов в торпидном состоянии снижается примерно в 10 раз по сравнению с контролем. В ходе пробуждения их количество быстро увеличивается и уже при температуре тела 30°С их уровень превышает летний контроль. Увеличение количества циркулирующих тромбоцитов во время пробуждения может быть связано с их быстрым высвобождением из костного мозга. Было установлено, что костный мозг у зимоспящих сусликов содержит почти вдвое больше мегакариоцитов по сравнению с костным мозгом негибернирующих животных [Szilagyi J.E., Senturia J.B., 1972]. Можно предположить, что снижение тромбоцитов необходимо для защиты спящих животных от местного тромбоза в условиях резкого снижения температура тела, брадикардии, низкой скорости кровотока, а также повышенной агрегации тромбоцитов крови [Xavier R.G. et al., 2007].

**Литература**

1. Bouma H.R., Strijkstra A.M., Boerema A.S., Deelman L.E., Epema A.H., Hut R.A., Kroese F.G.M., Henning R.H. Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel //Vet. Immunol. Immunopathol. 2010. Vol. 136. P. 319-323.

2. Buck C.L., Barnes B.M., Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator // Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 2000. Vol.

# СЕКЦИЯ V

# ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ РАБОТ ПО КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЮ И КРИОБИОТЕХНОЛОГИИ

# CRYOPRESERVATION OF ADHERENT CELLS USING A LN2-FREE SYSTEM

**Katkov I.I.1,[2], Jones S.B.[1], Zaitseva O.O.[3]**

[1]*CELLTRONIX, San Diego, California, USA*

[2]*Stem Cell Core, Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, Calfornia, USA*

[3]*Institute of Physiology, Syktyvkar, Russian Federation*

Cell based high-throughput screening (HTPS) and especially high content analysis (HCA) have been gaining momentum for drug development, toxicity screening, research studies and other medical, biological, and environmental applications. Safe, efficient and robust cryopreservation (CP), storage, and shipment of the cells of interest are pivotal for the majority cell based HCA . There have been attempts of freezing adherent cells (e.g., [Ji, 2004]), but the data are inconsistent. The other reason is an old and erroneous but persistent belief [Karlsson,, 1996; ,Zhurova, 2010] that CP of cells in adherent sate is always less advantageous (in regards to survival) than freezing of cells in suspension (e.g., in cryovials). In contrast, we in 2003-2004 hypothesized that biostabilization (both CP and xeropreservation by drying) of stem and other sensitive cells in adherent state was not only convenient but it also might result in lesser damage due to the lack of stresses specifically associated with detachment (anoikis), dissociation, centrifugation and other mechanical and chemical stresses. We developed a "universal" technological approach that we call ComfortFreeze. The major idea behind ComfortFreeze is to treat cells with minimal disturbance in the adherent state and to take the advantage of cell-to-cell and cell-to-matrix contacts that are beneficiary for the cells and can minimize the deleterious effects of stresses related to the CP process. The ComfortFreeze concept can be applied for hESCs, iPSCs, ESC/iPSC-derived progeny and other sensitive adherent cells. Moreover, for some types of cells, which are of specific interest of HCA such as neuronal networks, can not tolerate detachment from plate surface at all as it disrupts the delicate 2-dimensional structure of the neuronal connections. We have proven the concept for iPSCs (published them in [Katkov, 2011], summary of results is shown on Figs. 1). Promising preliminary results are obtained for cardiac and neural lineages as well. It showed that programmed cryopreservation in plates using 6-step protocol is advantageous over all other methods. It yields not only much higher survival but preserves colony morphology and cell pluripotency.

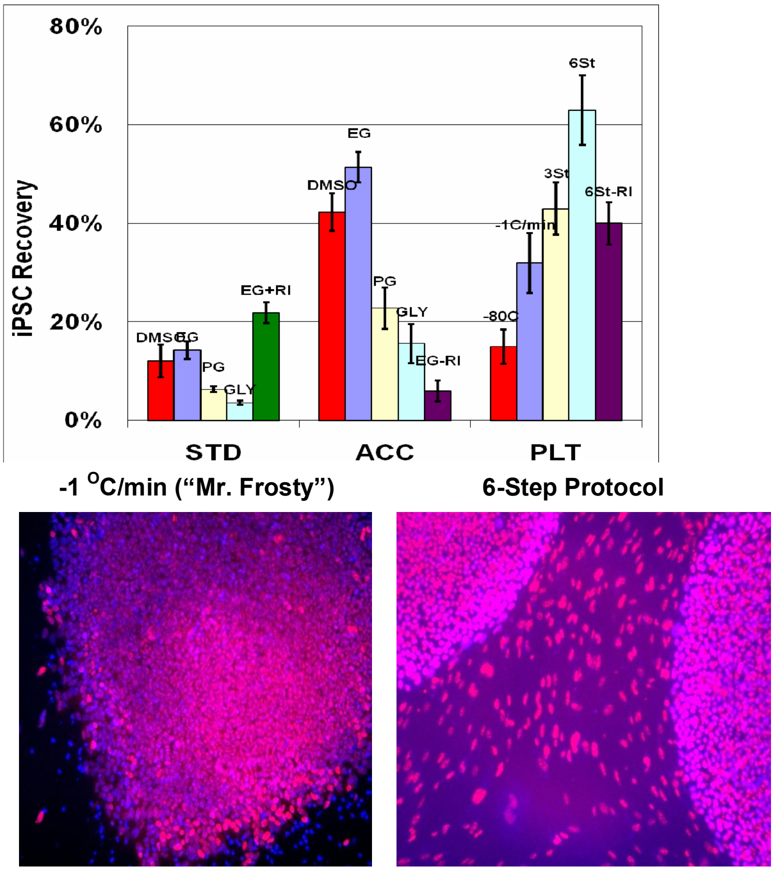



Figure 1 - Cryopreservation of Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSCs), (adopted from [Katkov, 2011])

(Left). Recovery of viable iPSCs after different protocols of cryopreservation (flow cytometry data). Freezing of iPSC 3 was performed using 3 basic protocols: STD: Standard routine slow uncontrolled freezing of small clumps with 10% of four different cryoprotecive agents (DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, and glycerol) in Nunc cryovials. ACC: Dissociation of the cells with Accutase and freezing and re-plating in the presence of a ROCK Inhibitor Y-27632 (Y) using the four cryoprotectants. PLT: Freezing of adherent cells in 4-well plates in ethylene glycol in a LN2 - based programmable freezer PF (Custom Biogenics, Inc, series 2100). The numbers on the group PLT represent 4 different programmed freezing protocols described in details in [1]

(Center and Right). Cryopreservation of adherent human iPSCs in plates.

Fluorescent microscopy of human induced pluripotent stem cells frozen in adherent state in 4-well plates ,combined Nanog + Hoechst. Top:, 1OC/min: one-step freezing in mimicking "Mr. Frosty") unprogrammed freezing. NOTE eroded edges of the colony and differentiation of the adjacent cells within the colony. Bottom, 6-Step: programmed freezing protocol. (described in [1]). NOTE clear distinct edges of the colonies in the 3-Step protocol. Flow cytometry has confirmed substantially higher attachment efficiency and a larger pool of viable iPSCs in cases of the six-step controlled freezing (Left).

ComfortFreeze™ - a novel device for liquid nitrogen free cooling and water-free thawing of adherent cells in multi-well test plates

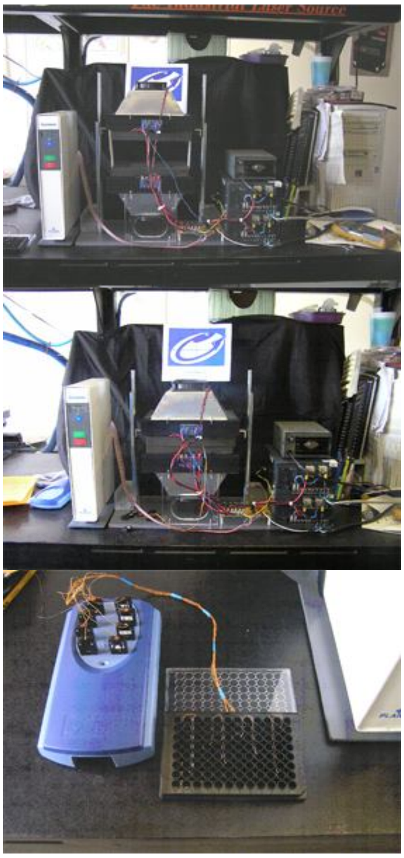


Figure 2 - ComfortFreezer™, a programmable bench-top LN2 - free freezer and water- free warmer for cryopreservation of cells in multi-well test plate. Left: Open (loading and reloading) position . Center: Working (cooling and warming) position. Right: 96-well plate instrumented with thermistors for measurement of spatial temperature distribution at 8 points.

The results described above have proven the ComfortFreeze principal for pluripotent stem cells, cardiomyocytes and neural progenitors However, our experiments have shown that the existing liquid nitrogen (LN2) injection-based programmable freezers are not suitable to the specifics tasks of CP of test plates as they consume high amount of LN2, are expensive, and need a large cryotank, thus, not complying with GMP/GLP requirements. Also, fast thawing of the frozen cells by immersing plate bottoms in water is much more effective than slow warming in air but it is cumbersome and introduces substantial risk of contamination. To resolve these problems and create a commercializeable system, we in CELLTRONIX have developed a completely novel, simple, inexpensive and robust device for cryopreservation of cells directly in multi-well test plates. It is based on tthermoelecric cooling (TEC) elements. The system neither needs LN2 for freezing and nor it requires water for fast thawing. The pilot sample for 96-well plate format has shown in some details on Figs 2, it can be used for other multiple well plates as they have identical external geometry by. Preliminary testing has shown that the temperature difference between the freezing chamber and ambient environment can be as high as -60C, which is sufficient for freezing plates to -40C ? -60 OC (in a cold room) and consequent plunging of a sealed plate it into liquid nitrogen or LN2-vapor. The device can also re-warm a plate. We will test it on hPSCs and on hPSC-derived cardiomyocytes (in collaboration with SBMRI) with the same principles to be applied to other types of hPSC progeny in the future (e.g., neuronal networks, etc).

Conclusions. A benchtop controllable multi-well liquid nitrogen free freezer/warmer, is feasible. It can bring substantial advantages for cell based screening industry, which supply cells for the customers as the cells can be both cryopreserved and then analyzed in the same plate (ready-to-go format). ComfortFreezer™, thus, can shift the whole paradigm of cryopreservation for cell based HTPS and HCA applications.

**References**

1. Ji et al, 2004, Biotechnology & Bioengineering, 88:299-312.
2. Karlsson & Toner, 1996, Biomaterials, 17:243-56.
3. Katkov et al, Stem Cells International, 2011:98160 (open access).
4. Zhurova et al, 2010, Reproduction, 61:133-41.

## ПРОГРАММНЫЕ ЗАМОРАЖИВАТЕЛИ PLANER: ВЕХИ РАЗВИТИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

**Рабчун М.А.**

*Группа компаний "АВТех" ("Аналитика и высокие технологии"), Москва, Россия*

E-mail: info@awt.ru, www.awt.ru, www.awtec.ru

Криоконсервация (от греч. криос - холод и лат. conservo - сохраняю) - низкотемпературное хранение живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания.

Криоконсервация тканей впервые была проведена с использованием семенной жидкости птиц в 1949 г. командой ученых Великобритании во главе с доктором Кристофером Польджем. Исследования коснулись человека в 1950-х годах, когда были отмечены случаи беременности в результате оплодотворения замороженной смермы. Однако быстрое погружение в жидкий азот не позволяло сохранять жизнеспособность некоторых образцов, таких как эмбрионы, костный мозг и стволовые клетки, делая их непригодными для использования после оттаивания. Более глубокое понимание механизма повреждения клеток подчеркнуло значение контролируемой (медленной) заморозки с целью повышения выживаемости клеток при таянии. Стала очевидной необходимость в регуляции скорости охлаждения, позволяющей осмотичесии сохранять оптимальные физические параметры с использованием криопротектора. В 1963 г. Питер Мазур (Национальная лаборатория Оук Ридж, США) показал, что при определенной низкой скорости заморозки внеклеточной жидкости, из клетки выходит достаточно воды, позволяя избегать внутриклеточных повреждений. (Mazur P., 1963). Скорость зависит от размера клеток и водопроницаемости их мембраны. На основе этих данных были разработаны модели криоморозильников с контролируемой скоростью замораживания, десятки тысяч которых используются сейчас в лабораториях, клиниках и криобанках по всему миру, удовлетворяя требованиям каждого случая на практике.

Газовая холодильная машина, построенная в Англии в начале 1970-х Пеггом, Хайесом и Кингстоном легла в основу первого программного замораживателя (Planer Products Ltd, Union Carbide Inc. and Matburn Ltd), и доктором Дэвидом Пеггом была проведена работа по криоконсервации костного мозга человека. В 1970-х и 1980-х годах во всем мире был отмечен значительный прогресс в области криоконсервации различных видов биологического материала. Оборудование для этих исследований предоставлял ряд производителей во главе с компанией Planer. Прорыв в этой области был совершен доктором Яном Вильмутом в 1973 году, когда ему впервые удалось произвести оплодотворение коровы замороженной яйцеклеткой, а сообщение о первом случае беременности человека в результате оплодотворения замороженной яйцеклеткой было сделано 1983 г. Аланом Траунсоном и Линдой Мор. Подобные случаи были описаны и другими учеными (Zeilmaker et al., 1984), а 28 марта 1984 в Мельбурне (Австралия) впервые было объявлено о рождении здоровой нормальной девочки (Зои Лейланд) в результате беременности после имплантации одного из пересаженных замороженных зародышей в матку матери. Группой врачей руководил доктор Карл Вуд, а при заморозке использовалось оборудование Planer.

По результатам изучения рождаемости в 23 странах мира сообщается, что в течение 2001 года в Европе было произведено около 42 000 пересадок замороженных эмбрионов, а в период с 1970 по 2008 гг. отмечено от 300 000 до 500 000 успешных случаев рождения в результате экстракорпального оплодотворения эмбрионами, подвергнутыми медленной заморозке в жидком азоте. Как показали анализы, такие эмбрионы будут здоровыми с той же вероятностью, что и те, которые не подвергались заморозке. Первая же криоконсервация яйцеклетки человека с использованием программируемого замораживателя Planer была успешно проведена доктором Кристофером Ченом в 1986 г.

Новый виток развития репродуктивной медицины был положен с началом экспериментов по заморозке тканей. Первую успешную трансплантацию ткани яичников осуществил профессор Жак Доннэ в 2003 году, также используя в своей работе морозильники Planer.

Все большее распространение получает программная заморозка и хранение пуповинной крови. Она является ценнейшим источником гемопоэтических стволовых клеток и клеток предшественников и эффективно используется в клинической практике при восстановлении кровеносной системы детей и взрослых. Предварительно пуповинная кровь должна быть подвергнута криоконсервации и хранению по программам, изначально разработанным для заморозки и хранения гемопоэтических стволовых клеток и клеток предшедственников костного мозга. Протокол проведения подобных процедур рекомендует медленное охлаждение, быстрое оттаивание и использование диметильсульфоксида (ДМСО) в качестве криопротектора.

В 1950 году команда онкологического научного центра Фреда Хатчинсона под руководством Е. Донела Томаса впервые провела трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) при помощи стволовых клеток костного мозга, показав, что при их внутривенном введении они могут восстанавливать костный мозг и производить новые клетки крови (ССЫЛКА). Извлеченные аутологичные ГСК после хранения в морозильной камере могут быть вновь введены в тело человека, где они должны заменить разрушенную ткань и возобновить нормальное производство клеток крови пациента. Трансплантация аутологичных ГСК является одним из стандартных методов второй линии терапии таких заболеваний, как лимфома. Аллогенная пересадка стволовых клеток может быть предпочтительна при других условиях, и при наличии факторов роста гемопоэтических стволовых клеток процедура трансплантация стволовых клеток в настоящее время чаще выполняется с использованием клеток, собранных из периферической крови, а не из костного мозга.

Перед криобиологией сейчас стоят непростые задачи поиска новых технологий криоконсервации органов и тканей для их последующей трансплантации, создание рецептур криоконсервации на основе инертных газов, создание технологий клеточной стрессоустойчивости для снижения повреждений, а также технологий длительного хранения при положительных температурах. Строгие требования к протоколам и программируемым режимам заморозки, хранению биоматериалов, созданию надежной системы контроля и архивации биоматериала, а также выполнению требований GMP при организации биохранилищ формируют жесткие правила подбора оборудования для комплектации криохранилищ разного объема и вместимости.

Группа компаний АВТех представляет в России оборудование компании Planer, которая уже на истоках развития криобиологии специализировалась на создании программируемых морозильников, позволяя ученым делать прорывы в биологии, медицине и производстве.

Наша линейка инкубаторов включает высокоточные настольные модели с контролем температуры, влажности и воздушной среды в рабочей камере. Это обеспечивает точность, необходимую при работе с клетками в фармацевтической и генетической областях исследований.

Ежедневно во всем мире для криоконсервации образцов используются тысячи наших программируемых замораживателей Planer с жидким азотом. За последние 40 лет мы постоянно пытались найти способы повысить жизнеспособность клеток, что привело к появлению множества новый моделей морозильников. Диапазон объемов камер составляет от 1,7 до 30 л., нижний предел температуры : -180$^o$ С, скорость замораживания: от -0,01 до -50$^o$С. На графическом дисплее отображаются данные о ходе процесса, которые доступны для просмотра и распечатки на встроенном принтере после завершения протокола. Многоуровневая система защиты образцов позволяет предупредить повреждение образцов при отключении электроэнергии и/или при сбое компьютера. Системы контроля над процессом и сохранения данных разделены. Контроллер может быть в любое время отсоединен от работающего замораживателя без потери целостности программы и остановки процесса.

Установкой, заслуживающей особого внимания, является оборудование с контролем линии плавления, используемое учеными в области программного стеклования хрящей, тканей яичников и более крупных образцов.

Мы также предлагаем емкости для хранения жидкого азота, газовые мониторы, системы оповещения о снижении уровня кислорода, датчики жидкого азота и $CO2$, и расходные материалы, такие как пакеты для крови, необходимые в лабораториях для работы с тканями, костным мозгом, стволовыми клетками или пуповинной кровью.

Наши программные замораживатели, инкубаторы и датчики используются при экстрапоральном оплодотворении, в ветеринарных исследованиях и цитологических лабораториях. Мы поставляем широкий спектр оборудования для исследовательских и клинических лабораторий - везде, где важно надежное хранение эмбрионов, пуповинной крови, костного мозга, ооцитов, спермы, кожи, ткани яичников, сердечных клапанов, кровеносных сосудов и т.д.

Группа компаний "АВТех" является также эксклюзивным поставщиком таких компаний, как Haier, Esco, MPW, Bioscape/Ehret, Ebro и др., и уже более 20-ти лет активно работает в различных сферах и направлениях науки и промышленности, где внедряются и используются инновационные технологии: химия и биотехнология, медицина, сельское хозяйство, ветеринария, санитарная безопасность, электронная промышленность, приборостроение, пищевая промышленность, фармпроизводство, экология, косметическая промышленность и др. Основные направления деятельности: инжиниринг и комплексные решения, валидация (аттестация, квалификация), консалтинг, осуществление поставок высокотехнологичного оборудования, сервисная и техническая поддержка.

**Литература**

1. Zeilmaker, G., Alberda, A., van Gent, I. et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril. 1984 Aug; 42(2): 293-6.

2.Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J Gen Physiol. Nov 1, 1963; 47(2): 347-369.

**Теоретические и практические аспекты**
**современной криобиологии**

Материалы
Международной заочной
научно-практической конференции
(24 марта 2014 г. Россия – Украина)

Оригинал-макет, печать - Соколова М.В.

Лицензия КР № 0025 от 20.06.96
Компьютерный набор. Формат 60х90 1\16. Бумага IQ allraund.
Усл.печ.л. 24,15. Заказ № 126. Тираж 150

---

Информационно-издательский отдел
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института физиологии
Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук
167982, ГСП 2, Республика Коми, г.Сыктывкар,
ул.Первомайская, 50