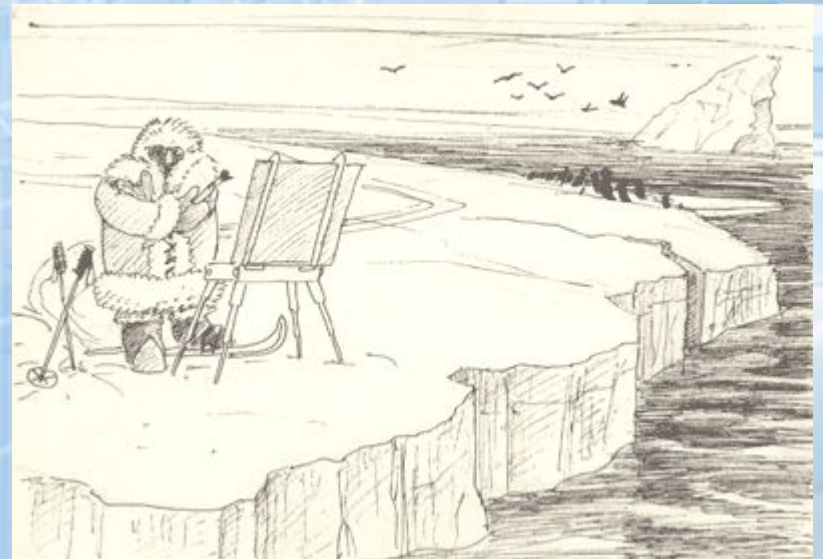
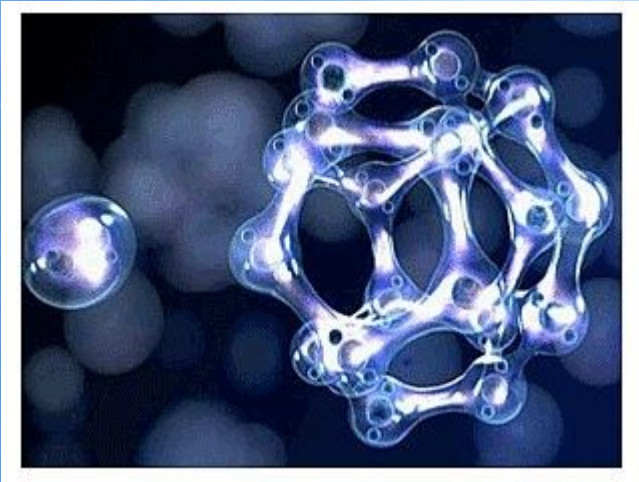


# Криосохранение крупных биологических объектов



- Наиболее интригующая область приложения криобиологии – науки о влиянии низких и сверхнизких температур на биологические объекты – поиск возможностей сохранения живых организмов или отдельных органов в состоянии глубокой заморозки.
- Методика криосохранения отдельных клеток или, например, эмбрионов разработана неплохо, но обратимое (т.е. с сохранением жизнеспособности после размораживания) замораживание крупных объектов наталкивается на серьезные препятствия.
- Основная трудность состоит в том, что при больших объеме и массе трудно добиться равномерного охлаждения. Неравномерное же замерзание приводит к серьезным и необратимым повреждениям клеток и тканей.
- Между тем решение этой проблемы могло бы помочь, например, созданию банка органов для трансплантации и тем самым спасти жизнь тысячам больных.
- Еще более заманчивой выглядит возможность сохранения в состоянии глубокого охлаждения тяжелобольного – до тех пор, пока медицина не окажется в состоянии ему помочь, может быть, через десятилетия.

- Наибольшую опасность при замораживании представляет механическое повреждение мембран клеток образующимися кристаллами льда. Образуюсь как вне, так и – что гораздо опаснее – внутри клеток, они разрывают липидный бимолекулярный слой, формирующий эти мембраны.
- Для защиты клеток от повреждения при замораживании используют специальные вещества – криопротекторы.
- Они делятся на две группы: проникающие внутрь клетки, или эндоцеллюлярные (диметилсульфоксид (ДМСО), ацетамид, пропиленгликоль, глицерин, этиленгликоль), и не проникающие или экзоцеллюлярные (полиэтиленгликоли и полиэтиленоксиды, фиколл, сахароза, трегалоза и др.), которые действуют снаружи, осмотически вытягивая из клетки воду.

- Наиболее широкое применение нашли глицерин и ДМСО. При добавлении их к воде температура ее замерзания понижается, достигая низшего значения при соотношении примерно 2:1. Эта наиболее низкая температура называется *эвтектической*, или *криогидратной*. При дальнейшем же охлаждении таких смесей размеры образующихся кристаллов льда оказываются столь мелкими (сравнимыми с размером кристаллической ячейки), что они не наносят значительных повреждений структурам клеток.
- Если бы можно было довести концентрацию криопротектора в живых тканях до эвтектической, это позволило бы полностью решить проблему повреждения тканей ледяными кристаллами. Однако при таких концентрациях любые известные криопротекторы оказываются токсичными.

- На практике используют концентрации криопротекторов значительно меньшие, чем эвтектические, – и при этом часть воды все же замерзает.
- Так при использовании 27%-ного раствора глицерина 40% присутствующей в клетке воды образует с глицерином эвтектическую смесь, остальная же ее часть замерзает.
- Однако, как показали эксперименты, проведенные в 1954–1960 гг. английским криобиологом Одри Смит, золотистые хомячки способны выживать в ситуации, когда в лед превращалось до 50–60% воды, содержащейся в тканях их головного мозга!



- Большое значение для решения проблемы обратимого замораживания имеет скорость охлаждения. При медленном охлаждении (в парах жидкого азота или в специальных программных замораживателях) кристаллы льда образуются в основном в межклеточном пространстве. По мере охлаждения они растут, оттягивая на себя воду из клеток. Как уже было сказано, это позволяет существенно уменьшить повреждения, наносимые кристаллами клеткам, – но и концентрация солей внутри клеток значительно возрастает, повышая риск денатурации белков.
- К сожалению, оптимальные скорости понижения температуры, при которых достигается компромисс между повреждающими действиями кристаллов льда и высокими концентрациями растворенных веществ, для разных типов клеток сильно различаются. Различны также и оптимальные для них концентрации криопротекторов.
- Это сильно затрудняет криосохранение органов и тканей, включающих несколько различных типов клеток, а тем более – целых организмов.

- При быстром охлаждении (например, опускании образца в жидкий азот) вода не успевает продиффундировать из клеток наружу; кристаллы образуются как вне, так и внутри клеток, но за счет более быстрого охлаждения они оказываются значительно мельче, чем в первом случае, и успевают образоваться не во всех клетках. Токсичных концентраций солей при этом удастся избежать, а продолжительность их воздействия оказывается меньше, как и продолжительность вредного воздействия криопротекторов. Последнее позволяет использовать более высокие их концентрации.



- При достаточно быстром охлаждении до  $0^{\circ}\text{C}$  и несколько ниже вода замерзает (кристаллизуется) не сразу.
- Сначала образуется переохлажденная жидкость. В упомянутых экспериментах Смит ей в отдельных случаях удавалось охладить золотистых хомячков до  $-6^{\circ}\text{C}$  без образования кристаллов льда.
- При этом кожа и конечности животных оставались мягкими. А после согревания хомячки оживали без видимых вредных последствий.
- Беременные самки (если переохлаждение имело место в первой половине срока беременности) приносили нормальных детенышей.



- Существует методика проведения хирургических операций на новорожденных детенышах мелких млекопитающих – например, мышатах.
- Наркоз в таком возрасте практически неприменим, и поэтому детенышей в течение 15–20 минут просто охлаждают до потери подвижности и чувствительности.
- Известен случай, когда при проведении таких исследований (влияние удаления вомероназального органа на поведение грызунов) в лаборатории одного из московских институтов нескольких новорожденных детенышей джунгарского хомячка по небрежности экспериментатора просто забыли лежащими на ватной подстилке в камере с температурой  $-12^{\circ}\text{C}$ .
- После извлечения – через 2–3 часа – они были совершенно твердыми, и их тела в буквальном смысле «издавали деревянный стук». Через некоторое время при комнатной температуре детеныши ожили, начали двигаться и издавать звуки...



- Жидкости в организме начинают замерзать обычно при  $-1... -3$  °C. Однако по мере того, как часть воды превращается в лед, концентрация растворенных веществ в оставшейся жидкости возрастает и температура замерзания этой жидкости продолжает снижаться.
- Температура полного замерзания различных биологических жидкостей сильно варьирует, но в любом случае оказывается ниже  $-22...-24$  °C.
- Вероятность образования «зародыша» кристалла льда за единицу времени в переохлажденной жидкости пропорциональна объему этой жидкости и сильно зависит от температуры: при  $-40$  °C и при давлении в 1 атм. кристаллизация чистой воды происходит практически мгновенно, но при еще более низких температурах (порядка  $-70$  °C скорость роста кристаллов замедляется за счет увеличения вязкости воды).
- Наконец, при температуре примерно  $-130$  °C рост кристаллов полностью приостанавливается. Если охлаждать жидкость достаточно быстро, чтобы «проскочить» температуру активной кристаллизации прежде, чем успеют сформироваться кристаллы опасного размера, вязкость возрастает настолько, что образуется твердое стеклообразное вещество.
- Это явление называется *стеклованием* или *витрификацией*.

- Если удастся охладить клетки или ткани до температуры стеклования, они смогут сохраняться в таком состоянии неограниченно долго, а полученные при этом повреждения окажутся несравненно меньше, чем при охлаждении с кристаллизацией.
- Собственно, это и явилось бы решением проблемы сохранения биологических объектов в состоянии глубокой заморозки.
- Правда, при оттаивании клеток для их оживления придется снова проходить опасный участок температур...

- Еще в 60-е гг. XX в. была предложена идея использовать для управления кристаллизацией воды высокое давление. Идея эта основана на понижении температуры фазового перехода вода/лед при повышении давления. При 2045 атм. температура кристаллизации чистой воды составляет  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Большого снижения температуры замерзания достичь таким образом не удастся – при дальнейшем росте давления она начинает вновь повышаться.
- Еще в 1967 г. американец М.Д. Персидски и его коллеги поставили эксперименты по замораживанию почек собаки. Исследователи подвергали почки перфузии 15%-ным раствором диметилсульфоксида (перфузия – введение веществ в биологический объект через систему кровеносных сосудов), после чего охлаждали их с одновременным повышением давления, так чтобы в каждый конкретный момент температура не была ниже точки замерзания, соответствующей данному давлению. Когда минимальное значение температуры (в данном случае, благодаря присутствию криопротектора оно составило около  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) было достигнуто, давление снижали.

- Для того, чтобы кристаллизовалась вся вода, нужно было бы перед снижением давления охладить образец до температуры примерно  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  – однако в этом случае лед начал бы образовываться гораздо раньше. М.Персидски решил проблему путем циклического приложения давления.
- Разогревшийся до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  после первого снятия давления образец начинали охлаждать вновь – одновременно с повторным повышением давления. При очередном его «сбросе» успевала замерзнуть следующая порция жидкости, и т.д.
- В результате удалось достичь практически полной и «безвредной» кристаллизации воды, после чего температуру можно было уже безбоязненно понизить до  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  (и ниже) при обычном атмосферном давлении и сохранять почку в таком состоянии неограниченно долго.

- В дальнейшем техника замораживания при высоком давлении использовалась при подготовке биологических образцов для микроскопических исследований.
- Для того, чтобы сделать достаточно тонкий срез, образец нужно предварительно перевести в твердое состояние, однако при обычной заморозке структуры клеток при этом повреждаются настолько, что изучать оказывается практически нечего...

- Конечно, необходимо решить еще целый ряд проблем: в ходе экспериментов отработать оптимальный режим охлаждения, подобрать конкретные криопротекторы и т. д.
- Например, при прохождении циклов «сжатие с охлаждением – снятие давления» охлаждение происходит только с поверхности объекта.
- Это приводит к тому, что на периферии лед будет образовываться, тогда как в центре может, наоборот, происходить таяние уже имеющегося льда за счет повышения давления.
- Бороться с этим можно, как понижая температуру медленнее (и позволяя объекту охлаждаться более равномерно), так и повышая концентрацию веществ-криопротекторов в наружных слоях.
- При этом не обязательно повышать давление до максимальных значений. Можно, увеличив число циклов, оставаться в пределах заведомо безопасных 500–1000 атмосфер.

# Перспективы

- Так что имеющиеся данные вполне позволяют надеяться на использование высоких давлений для управления кристаллизацией свободной воды и криосохранения крупных биологических объектов-органов и даже целых организмов.
- Работы в этом направлении ведутся в Институте биофизики клетки РАН (Лаборатория криоконсервации генетических ресурсов под руководством Э.Н. Гаховой) совместно с Институтом биомедицинских технологий и ГосНИИ ВТ им. С.А. Векшинского.