

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОХРАННОСТЬ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Основной целью консервирования клеток при низких температурах и в условиях гипотермии является увеличение сроков сохранения их жизнеспособности *in vitro* путем снижения скоростей биохимических реакций. Консервирование является важным звеном в решении ряда важнейших медицинских, экологических и хозяйственных проблем. К этим проблемам относятся:

- тканевая и клеточная терапия, трансплантация органов, имплантация эмбрионов и искусственное осеменение;
- сохранение генофонда редких и исчезающих видов животных и растений;
- селекция и воспроизводство ценных и высокопродуктивных пород животных и сортов растений;
- хранение ценных штаммов микроорганизмов, клеточных культур и т.д.

Гипотермическое хранение, осуществляемое, как правило, в условиях бытового холодильника при температурах $0\div 4^{\circ}\text{C}$ дает возможность увеличить срок хранения изолированного из организма биообъекта до нескольких суток. Заметим, что этот срок значительно меньше времени функционирования клеток в физиологических условиях, но гораздо больше времени хранения изолированного из организма биообъекта в условиях умеренной (20°C) гипотермии. В последнем случае клетки гибнут в течение часов.

Причину гибели клеток в условиях гипотермии следует, по-видимому, искать в нарушении ионного баланса в результате сниженной активности Na^+/K^+ -насоса. Характер повреждения – набухание клеток – заставляет предполагать наличие потока внеклеточных веществ (Na^+ и Cl^-) внутрь клетки, нарушающего осмотическое равновесие в системе клетка – окружающая среда. В пользу такого предположения свидетельствует, в частности, возможность увеличения сроков гипотермического хранения гепатоцитов крысы в средах «внутриклеточного типа» (содержащих повышенное содержание K^+ и пониженное содержание Na^+) и «сахарозно-солевой среде». В первом случае имеет место снижение градиента концентрации Na^+ на мембране, во втором защита осуществляется благодаря поддерживающему осмотическое равновесие непроникающему компоненту – сахарозе.

В процессе криоконсервирования криообъект подвергается многофакторному воздействию. Для удобства анализа влияющих на сохранность клеток факторов процесс криоконсервирования условно разбивают на несколько этапов.

1. Забор материала – извлечение биообъекта из физиологической системы и помещение его в псевдофизиологическую среду (физиологический

раствор). Процедура извлечения клеток, тканей и органов из организма сопровождается умеренной (+20°C) или глубокой (0÷4°C) гипотермией.

2.Замещение «физиологического» раствора криозащитным (обычно гипертоническим) и экспозиция в нем клеток.

3.Охлаждение биообъекта в контейнере:

- до начала фазового перехода «вода-лед»;
- в зоне фазового перехода;
- до температуры хладоагента.

4.Хранение в замороженном состоянии.

5.Отогрев до положительной температуры.

6.Замена среды криоконсервирования «физиологической средой».

Забор материала сопровождается действием на клетки нескольких факторов.

1.Выделение клеток из изолированных органов (гепатоцитов из печени, спленоцитов из селезенки, тимоцитов из тимуса и т.д.) связано с механической деструкцией ткани и ее ферментативной обработкой (колагеназа). Нарушение клеточных контактов сопровождается гибелью части клеток и повреждением мембран их основной массы. Для репарации этих повреждений может применяться краткосрочное культивирование при физиологических температурах.

2.В результате некомпенсируемого действия связывающих агентов, изменения электростатических взаимодействий и т.д. в выделенных суспензиях клеток может происходить образование клеточных конгломератов. С целью исключения подобных эффектов применяют антикоагулянты (гепарин, цитрат натрия), снижающие эффективность действия связывающих факторов.

3.На энергетике клеток (в частности, работе Na⁺-K⁺-насоса) отражается гипоксия и недостаток питательных веществ, гипотермия. Преимущество глубокой гипотермии перед умеренной может быть связано с более выраженным замедлением при глубокой гипотермии проникновения в клетку внеклеточных ионов. Одной из причин различной устойчивости разных клеток к гипотермии и гипоксии могут быть различия в их метаболической активности. Так длительность хранения эритроцитов может быть связана с тем, что АТФ в них расходуется, главным образом, на поддержание работы Na⁺-K⁺-насоса.

Глубокая гипотермия (0÷4°C) обеспечивает более длительное хранение клеток, чем умеренная. Но такое хранения все же не способно исключить протекание процессов, приводящих к гибели клеток. Оценка сохранности клеток в процессе относительно продолжительной гипотермии показывает, что в препаратах часть клеток набухает, а другая становится проницаемой для витальных красителей (метиленового синего, азур-эозина). Набухание клеток является результатом проникновения в них внеклеточных растворов и воды, поступающей в клетки в результате нарушения осмотического равновесия на мембране. В свою очередь, клетки проницаемые для красителя, можно, по-видимому, считать потенциально жизнеспособными.

Культивирование может восстановить их свойства. К сожалению, наших знаний о механизмах проникновения красителя и внеклеточных ионов в настоящее время недостаточно для более глубокой интерпретации этих данных.

Замещение «физиологического» раствора криозащитной средой проводится с целью уменьшения количества образующегося льда и снижения эффектов концентрирования солей при замораживании. Эта цель может быть достигнута применением достаточно высоких (гипертонических) концентраций криопротекторов. В практике криоконсервирования наиболее часто криопротекторы используются в концентрациях $0,5 \div 3M$. Результатом взаимодействия клетки с непроникающими криопротекторами является уменьшение ее объема в результате дегидратации. Степень дегидратации с увеличением концентрации криозащитного раствора возрастает.

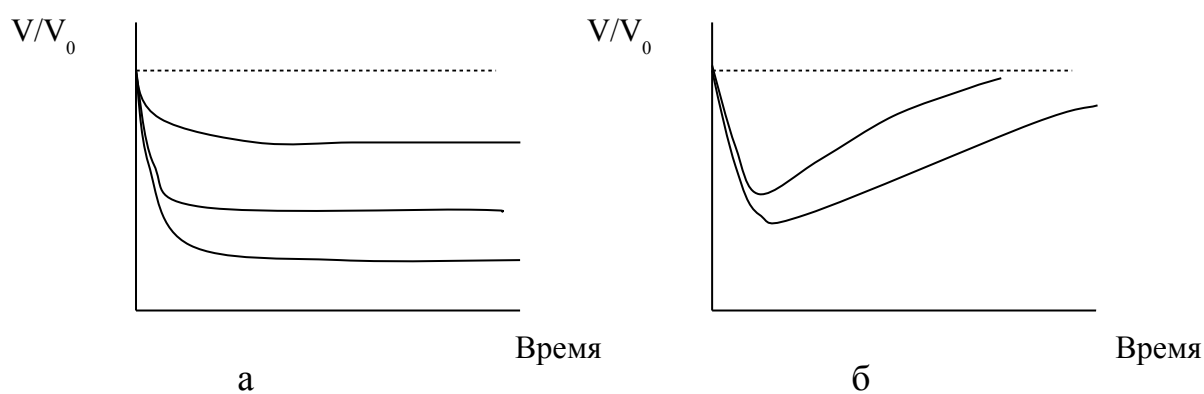
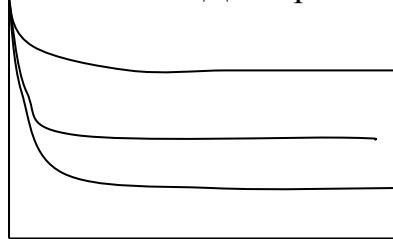


Рис.1 Изменение объема клеток в растворах непроникающих (а) и проникающих (б) криопротекторов

В растворах проникающих криопротекторов за фазой дегидратации следует фаза регидратации. Длительность фазы регидратации зависит от проникающей способности криопротектора, проницаемости мембран, геометрии клеток и температуры. Чем быстрее проникает криопротектор в клетку, тем быстрее восстанавливающая осмотическое равновесие вода восстанавливает клеточный объем. Резкое добавление к клеткам высоких концентраций криопротекторов может стать причиной:

- резкого повышения проницаемости мембран для криопротектора;
- резкого повышения проницаемости мембран для внеклеточных ионов, приводящего к набуханию клеток;
- грануляции внутриклеточного содержимого, сопровождаемой потерей гранул и обесцвечиванием клеток;
- образования крупных трансмембранных дефектов, через которые клетки могут терять крупные молекулы, например гемоглобин.

Одной из причин, приводящих к повреждению клеток на этом этапе может быть гипертонический стресс, связанный со значительной деградацией клеточных мембран при обезвоживании или чрезмерной дегидратацией клеток. Для предотвращения гипертонического стресса можно



использовать процедуры многоэтапного или капельного добавления криозащитных сред.

Помимо осмотического действия криопротекторы могут обладать и более или менее выраженным цитотоксическим. Механизмы цитотоксического действия криопротекторов еще изучены недостаточно. Тем не менее установлено, что цитотоксический эффект может быть снижен при понижении температуры, уменьшении концентрации криопротектора и времени контакта с ним клеток. Снижение цитотоксических эффектов при понижении температуры продемонстрировано при изучении взаимодействия хорошо проникающих криопротекторов ряда амидов со сперматозоидами петуха и непроникающего криопротектора ПЭО-1500 с эритроцитами человека. Не исключено, что в обоих случаях речь может идти о взаимодействии криопротекторов с липидным бислоем. Тем не менее имеются и свидетельства о влиянии некоторых криопротекторов (1,2ПД) на цитоскелетные структуры. Снизить или исключить цитотоксическое действие криозащитных сред можно:

- осуществляя отбор криопротекторов по степени цитотоксического действия на изучаемый биообъект;

- снижая концентрацию отдельных компонентов в криозащитной среде за счет введения в нее дополнительных компонентов;

- уменьшая время контакта криопротекторов с клетками;

- понижая температуру эквilibрации.

Таким образом, на этапе замены «физиологической» среды криозащитной особо важна роль осмотических и цитотоксических эффектов, а, по крайней мере, одним из проявлений повреждения клеток на этом этапе криоконсервирования является нарушение проницаемости плазматических мембран для не проникающих (в норме) ионов.

Охлаждение до начала фазового перехода «вода-лед».

Этот этап может представлять опасность для некоторых клеток, если охлаждение достаточно быстрое и захватывает достаточно широкий диапазон температур (например: $37 \div 0^{\circ}\text{C}$). Дегидратация повышает чувствительность многих клеток к быстрому охлаждению в широком диапазоне температур (см. «температурный шок»). На практике, однако, охлаждение начинается от комнатной температуры, а не от 37°C . К тому же, практика криоконсервирования не всегда предусматривает дегидратацию клеток перед замораживанием. Таким образом, охлаждение до начала фазового перехода не должно приводить к повреждению клеток, хотя не исключена возможность пролонгации эффектов данного этапа на следующий.

К факторам, характеризующим этап охлаждения можно отнести:

- снижение скоростей химических реакций;

- температуро-зависимые перестройки в липидном бислое;

- увеличение растворимости газов;

- снижение функциональной активности некоторых интегральных белков;

-нарушения активного транспорта ионов;

Интересно отметить, что при охлаждении до температур $6\div 8^{\circ}\text{C}$ происходит (обратимое) прекращение двигательной активности сперматозоидов трутня. Роль этих факторов в криповреждении, однако, малопонятна.

Охлаждение в зоне фазового перехода «вода-лед»

Действующие на этом этапе факторы и степень их проявлений определяются составом криозащитной среды, скоростью охлаждения и степенью переохлаждения биообъекта до начала кристаллизации. Незащищенные криопротектором клетки при медленном охлаждении погибают от эффектов внеклеточного кристаллообразования, а при быстром - от эффектов вне- и внутриклеточного кристаллообразования.

К факторам, влияющим на сохранность клеток, **замораживаемых медленно**, относят:

-внеклеточный лед, рост кристаллов которого приводит к концентрированию клеток в малых объемах жидкой фазы и действию на них кристаллизационного давления;

-электрические поля, возникающие на границе льда и жидкой фазы в результате неодинакового захвата льдом ионов разного знака;

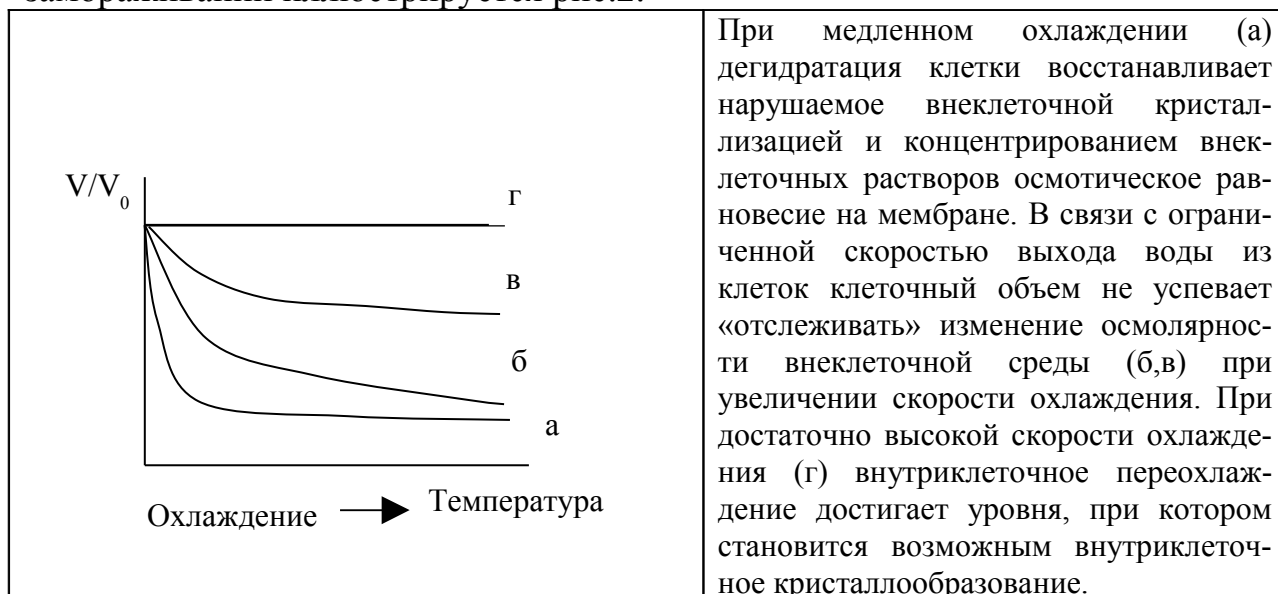
-осмотическое действие повышенных концентраций солей, нарушение барьерных функций мембран для в норме слабо проникающих ионов;

-сдвиги pH в результате неодновременного выпадения из раствора компонентов буфера в зоне эвтектической кристаллизации.

Деструктивные изменения незащищенных криопротектором клеток, если скорость охлаждения достаточно мала, могут проявляться уже на этапе замораживания. Эритроциты теряют гемоглобин, ядродержащие клетки набухают и обесцвечиваются в медленно сужающихся каналах между кристаллами льда, затем, по мере сужения каналов снова сжимаются. При увеличении темпа охлаждения разрушение клеток происходит на этапе отогрева.

Клетки, **замораживаемые быстро**, дегидратации не подвергаются. Эффекты концентрирования клеток в каналах в значительной мере исключаются. При достаточно быстром охлаждении уменьшается количество внеклеточного льда, его структура становится мелкокристаллической. В этих условиях основным фактором повреждения становится внутриклеточное кристаллообразование. Его повреждающее действие проявляется на этапе отогрева. Некоторые исследователи связывают повреждение внутриклеточным льдом с его рекристаллизацией. Не исключено, однако, что неравновесные условия внутриклеточного кристаллообразования уменьшают количество образуемого при замораживании льда, но «докристаллизация» при отогреве восполняет его количество до повреждающего уровня. В этом случае речь должна идти не только о рекристаллизации, сближающей разъединенные биологические структуры, но и о продолжении роста кристаллов льда на этапе отогрева.

Зависимость объема клеток от температуры при медленном и быстром замораживании иллюстрируется рис.2.



При медленном замораживании в присутствии **криопротекторов** каналы между кристаллами льда становятся тем шире, чем выше концентрация криозащитного вещества. Увеличение переохлаждения до начала кристаллизации измельчает структуру льда. Кристаллизация начинается при более низкой температуре и захватывает более широкий температурный диапазон. Вероятность попадания клеток в замкнутые включения во льду и подвергаться действию кристаллизационного давления уменьшается. Разветвленная система каналов способствует релаксации возникающих в системе напряжений. Степень концентрирования солей уменьшается, однако возрастает вклад самого криопротектора в осмотическое давление внеклеточной среды.

Высокомолекулярные (непроникающие в клетки) криопротекторы обычно используются в высоких весовых (~20%), но низких молярных (~0,5М) концентрациях. К моменту витрификации молярная концентрация их растворов обычно не превышает 2М. Тем не менее, они не позволяют концентрации внеклеточной соли вырасти более, чем в 3÷4 раза.

Низкомолекулярные (проникающие) криопротекторы при использовании в высоких весовых концентрациях (более 20%) также сильно ограничивают концентрирование внеклеточных солей. Но их собственная молярная концентрация к моменту витрификации может достигать 7,5М. Это может представлять опасность для клеток, если учесть, что в процессе замораживания поступление криопротекторов в клетку ограничено выраженным уменьшением проницаемости для них биомембран при пониженных температурах. Эффект низкомолекулярных криопротекторов, особенно применяемых в малых (~5%) концентрациях, может быть сравним с эффектом солей.

При быстром замораживании в присутствии **непроникающих криопротекторов** внутриклеточная кристаллизация может быть исключена

за счет предшествующей замораживанию дегидратации. Однако, только дегидратации иногда может быть недостаточно.

Применение проникающих криопротекторов при быстром замораживании в малых концентрациях не способно предотвратить внутриклеточное кристаллообразование и поэтому нецелесообразно. Насыщение клеток большими концентрациями криопротекторов чревато цитотоксическими эффектами, к тому же усложняется проблема удаления криопротекторов из клеток после отогрева. Более часто на практике используется процедура подготовки к замораживанию, включающая два этапа: насыщение клеток криопротектором в растворах относительно невысоких концентраций (~1М) с последующей кратковременной выдержкой в растворе повышенной концентрации (~3М), обеспечивающей дегидратацию клеток перед замораживанием. Второй этап, как правило, проводится при пониженной температуре (0÷4⁰С), иногда в среду вводят непроникающую добавку, например сахарозу. Комбинация насыщения криопротектором с дегидратацией наиболее эффективно предотвращает внутриклеточное кристаллообразование при быстром замораживании.

Охлаждение до температуры хладагента

Дальнейшее охлаждение биообъекта после завершения(иногда неполного) фазового перехода «вода-лед» приводит к стеклованию незамерзшей фазы. В отсутствие криопротектора полное стеклование возможно только в клетках. Этот этап не представляет серьезной опасности для клеточных суспензий, хотя и не исключено, что растрескивание стекла в результате термомеханических напряжений может повреждать часть клеток. Особую опасность термомеханические напряжения могут представлять при замораживании органов. Избежать растрескивания образцов можно снижая темп охлаждения на данном этапе.

Хранение в замороженном состоянии

В качестве хладагентов можно использовать твердую углекислоту (-79⁰С), жидкий азот (-196⁰С). Использование жидкого гелия хотя и возможно, но сопряжено со значительными методическими сложностями. Хранение в жидком азоте в течение десятков лет не отражается на жизнеспособности погруженных в него биообъектов. Падение сохранности на этом этапе может быть обусловлено периодическими снижениями уровня азота в результате испарения и периодическим попаданием образцов в пары азота. Хранение при температурах -10÷ -20⁰С широко применяется для хранения биологических препаратов, в частности белкового происхождения. Применение такого хранения для клеток требует применения криозащитных сред и не может быть продолжительным.

Отогрев до положительной температуры

При отогреве биообъекта от температуры хладагента до зоны фазовых превращений воды основным повреждающим фактором могут быть термомеханические напряжения. После девитрификации быстро замороженных образцов при медленном отогреве методом калориметрии регистрируется «докристаллизация» - включение части образовавшейся

жидкой фазы в кристаллическую структуру, сопровождающаяся повышением концентрации внеклеточных растворов. Если при замораживании имела место «эвтектическая кристаллизация», калориметрическая кривая при отогреве регистрирует плавление эвтектики – поглощение тепла. В зоне фазовых превращений наблюдается рекристаллизация – рост крупных кристаллов за счет мелких. Это превращение не сопровождается выделением (поглощением) тепла и калориметрически не регистрируется. Рекристаллизационные изменения во внеклеточной среде могут протекать одновременно с рекристаллизацией и плавлением внутриклеточного льда. Рекристаллизацию относят к факторам повреждения, хотя механизм ее действия остается неопределенным. С негативными последствиями рекристаллизации можно бороться повышая скорость отогрева. После плавления внеклеточного льда клетки могут обезвоживаться при отогреве. Вносит ли обезвоживание при отогреве вклад в криоповреждение неясно. Плавление внеклеточного льда разбавляет концентрированные внеклеточные растворы. Возвращаясь в исходную среду замораживания клетки, не получившие «инъекции» внеклеточного раствора в ходе замораживания-отогрева, восстанавливают свой объем. Если такая «инъекция» имела место, клетки увеличивают свой объем выше исходного – набухают.

Среди действующих на этапе отогрева факторов можно упомянуть также выделение пузырьков газа, растворимость которого при повышении температуры снижается.

Повышение температуры на этапе отогрева изменяет свойства биомембран, возвращает к норме их проницаемость, скорости биохимических реакций.

В практике криоконсервирования считается перспективным повышение скорости повышения температуры на этапе отогрева.

Замена среды криоконсервирования изотонической средой

При возвращении насыщенной криопротектором клетки в изотоническую среду в нее устремляется вода, восстанавливая осмотическое равновесие на мембране. По мере выхода из клетки по концентрационному градиенту криопротектора объем клетки восстанавливается. Критический (допустимый) уровень набухания ~ 1,2М. Клетки могут при набухании максимально увеличивать свой объем в 1,8÷2 раза, хотя имеются примеры и более значительного набухания (гепатоциты). Для исключения набухания или уменьшения его уровня в среду отмывания вводят непроникающую добавку, например сахарозу. Динамика объемных изменений при отмывании клеток представлена на рис. 4.

Таким образом, в процессе криоконсервирования биологические объекты подвергаются действию большого числа факторов. Действие некоторых из этих факторов можно исключить (или свести к минимуму) с помощью достаточно простых процедур. Важнейшими параметрами, влияющими на сохранность биообъектов в процедуре криоконсервирования являются:

- способ получения препаратов, температура и среда выделения;
- скорости (режимы) охлаждения и отогрева;
- вид и концентрация криопротектора;
- время и температура экспозиции в криозащитной среде;
- температура хранения;
- наличие непроникающей добавки в среде отмывания;
- процедуры насыщения криопротектором и удаления криопротектора из клеток.

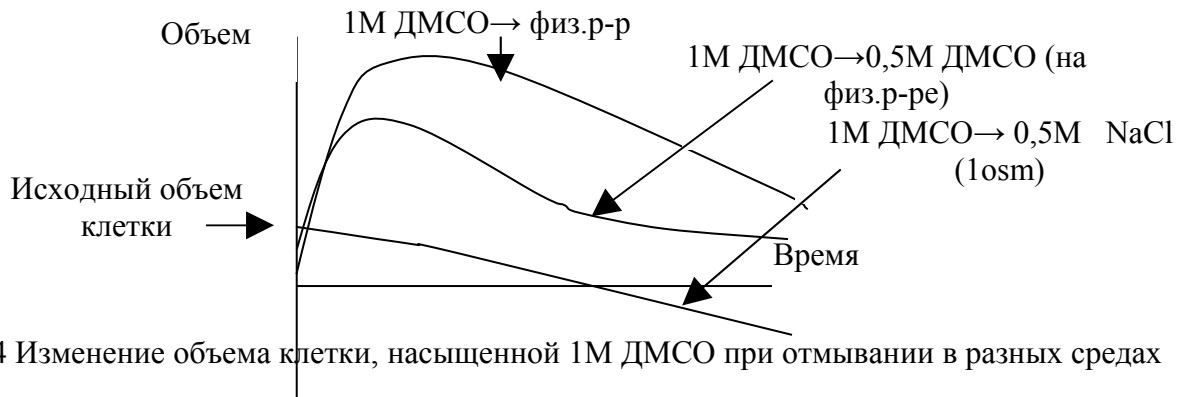


Рис.4 Изменение объема клетки, насыщенной 1М ДМСО при отмывании в разных средах