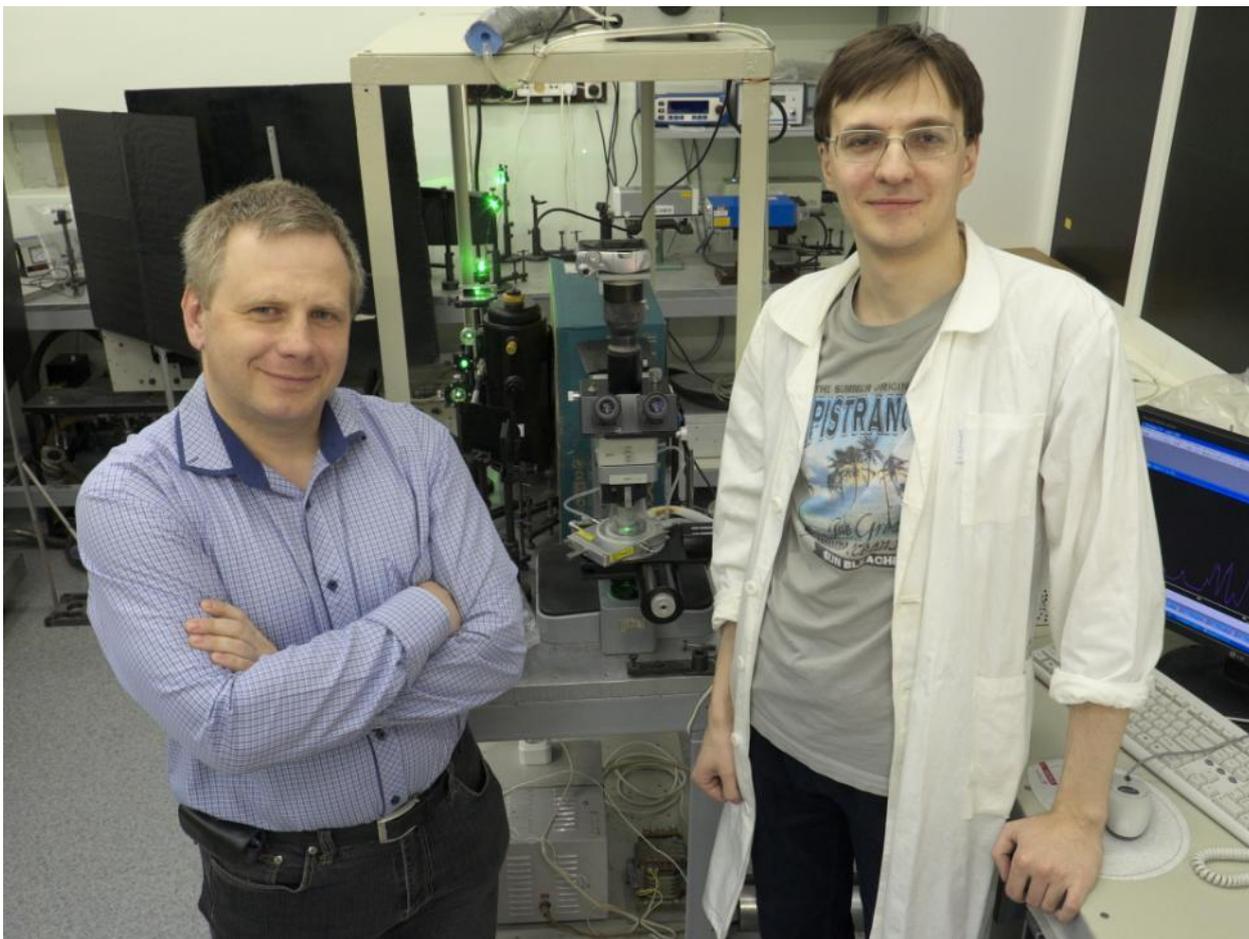


В бережных объятиях холода



Криоконсервация – научное направление, которое набирает сегодня всё большую популярность. Она позволяет, «зарезервировать» на будущее клетки, культуры, ткани, сохранять редкие линии лабораторных мышей и исчезающие виды животных. А также ответить на вопросы: какие механизмы отвечают за «хладовой анабиоз», как замораживать и размораживать биологические объекты правильно, чтобы они при этом не погибли, и возможно ли осуществлять такие эксперименты с более сложными организмами?

Использование низких температур обеспечивает остановку биохимических процессов в клетках, благодаря чему живые объекты могут сохраняться очень долго. На сегодняшний день биологи уже научились эффективно замораживать клетки, определённые культуры, биологические жидкости (например, кровь, сперму), ранние эмбрионы некоторых организмов. Однако делать это с более крупными и сложными биологическими объектами, например с изолированными органами (что актуально для трансплантации) или с целыми пусть даже очень маленькими многоклеточными организмами пока получается существенно хуже. Одна из основных причин – недостаточное понимание процессов, происходящих в клетках при сильном охлаждении, криоконсервации и выходе из этого состояния. К тому же режимы замораживания и размораживания для того или иного биологического объекта до сих пор зачастую выбираются долгим путём перебора.

Учёные из [Института автоматки и электрометрии](#) СО РАН предложили использовать для этих задач метод комбинационного рассеивания света (КРС). «Возьмём молекулу воды. Её

можно представить в виде колеблющейся конструкции состоящей из грузиков (атомов) и пружинок (валентных связей). Частоты колебаний зависят от жесткости пружинок, массы грузиков, их количества и взаимного расположения, – объясняет принципы КРС кандидат физико-математических наук Константин Александрович Окотруб. – Если начать облучать молекулу светом, фотоны с некоторой вероятностью передадут ей часть своей энергии, а их энергия в свою очередь уменьшится. Благодаря этому изменяется длина волны излучения». С помощью спектрометра учёные измеряют длины волн рассеянного излучения, определяют частоты колебаний в исследуемом объекте и делают выводы о том, что в этот момент происходит с объектом.

«Например, мы измерили КРС воды и увидели, что на некоторых частотах происходят колебания молекул. Если вода превращается в лёд, спектр меняется. Это аналог отпечатков пальцев. Каждый спектр соответствует определённому соединению и даже определённому его состоянию», – комментирует заведующий лабораторией спектроскопии конденсированных сред доктор физико-математических наук Николай Владимирович Суровцев. Тогда как другие методы принятые в биологии (окрашивание, люминесценция) используются для работы при комнатных температурах, комбинационное рассеяние света позволяет детально рассмотреть, что происходит с клеткой по ходу замораживания.

С помощью спектроскопии КРС можно исследовать фазовые переходы, отслеживать перераспределение вещества в замораживаемых биологических объектах и даже биологические процессы. Например, зарядовое состояние цитохромов – белков, участвующих в процессе клеточного дыхания (хотя при облучении клеток это состояние меняется из восстановленного в окисленное). «Здесь исследуются два вклада: воздействие нашего излучения и, собственно, естественные окислительно-восстановительные реакции в которых участвуют цитохромы и которые в клетке есть всегда, независимо от того, облучают её или нет, – рассказывает Константин. – Мы нашли способ разделить эти вклады, рассмотрели окислительно-восстановительные реакции цитохромов при разных температурах и получили картину того, как они замедляются при переходе в анабиоз».

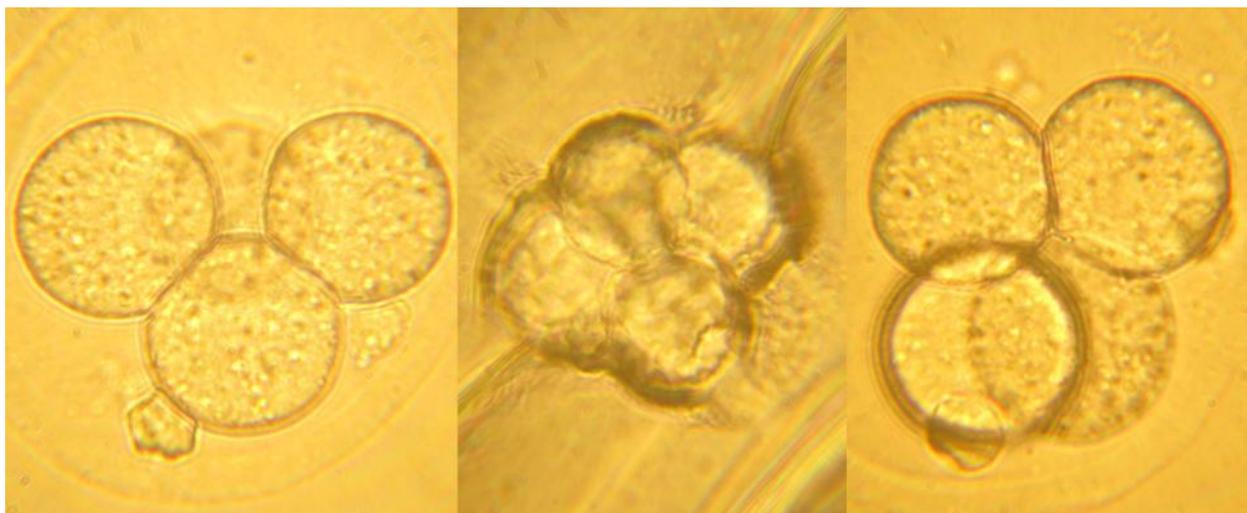
«Интерес к скорости протекания реакций цитохромов связан с тем, что значительную часть энергии (до 90 %) клетка получает из процесса клеточного дыхания. Его подавление приводит к остановке многих других биологических процессов. Когда известно, как при замораживании уменьшается скорость биологических реакций, можно спрогнозировать: если мы клетку будем хранить, например, в обычной морозилке (-20 °C), или в специальной (-70 °C), или в жидком азоте (-196 °C), повлияет ли это на срок её хранения?», – говорит Николай Суровцев.

К тому же, известно, что при замораживании клетка попадает в экстремальные условия. И если бы скорости реакций в замороженном состоянии протекали так же быстро, как и в комнате, то она не протянула бы и нескольких минут. Поэтому анабиоз является ключевым фактором не только для консервации, но и для защиты клетки от той среды, в которой она оказывается при замораживании.

«Один из наблюдаемых с помощью метода КРС эффектов заключается в том, что после образования льда по причинам, до конца ещё не выясненным, происходит увеличение доли цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии, – рассказывает Константин. – По общепринятому представлению образование льда может повредить клетку двумя способами: непосредственно механическими повреждениями и за счет обезвоживания препарата (вода уходит из растворов в лёд). Однако наши результаты показали, что ни первый, ни второй сценарий сами по себе не должны приводить к такому изменению

состояния цитохромов. Наиболее вероятной сейчас выглядит гипотеза, что когда клетка захватывается льдом, она попадает в замкнутый объем с ограниченным доступом молекулярного кислорода и начинает «задыхаться». Недостаток кислорода в свою очередь может привести к нарушению окислительных процессов, в первую очередь тех, которые связаны с клеточным дыханием».

Через некоторое время после начала исследования замораживаемых клеток методом КРС к учёным [ИАиЭ СО РАН](#) обратились сотрудники Сектора криоконсервации и репродуктивных технологий [Института цитологии и генетики](#) СО РАН. Биологам было интересно изучить процессы, которые происходят при замораживании и криоконсервации ранних (преимплантационных) эмбрионов млекопитающих. Исследовать это оказалось возможным с помощью метода комбинационного рассеяния света.



«Преимплантационный эмбрион – это та удивительная стадия в развитии млекопитающих, когда зародыш состоит всего из нескольких клеток. Здесь его ещё достаточно легко можно извлечь из репродуктивных путей и подвергнуть замораживанию и криоконсервации. Но дело в том, что эмбрионы одних животных консервируются в холоде успешно (мыши), а других – гораздо хуже (хищники, свиньи), и пока неизвестно, с чем это связано и что нужно сделать для преодоления барьера», – говорит Николай. Такая проблема актуальна, например, для сохранения в природе исчезающих видов диких кошачьих. Поскольку многие из них являются редкими и исчезающими, то методом перебора – последовательной апробации каждого протокола поставленную задачу решать не представляется возможным. «Пока что наш совместный проект с учёными сектора криоконсервации сфокусирован главным образом на исследовании криобиологических феноменов и лежащих в их основе биофизических механизмов, главным образом – на эмбрионах мышей и крыс. В будущем, мы планируем расширить наше сотрудничество также на решение задачи криоконсервации кошачьих, что будет важным шагом к сохранению генетических ресурсов этих исчезающих харизматичных животных», – говорит Константин Окотруб.

Исследования с помощью метода, предложенного сибирскими учёными, помогут пролить свет и на загадку разной сохранности эмбрионов. Научным сообществом экспериментально выявлено, что в эмбрионах и ооцитах (называемых также яйцеклетками) кошки содержится большое количество жировых капель. Одна из основных их функций – зарезервированная энергия, необходимая для развития зародышей. Семя хотя бы раз успешно замораживали у многих видов диких кошек,

эмбрионы – всего у нескольких, а с женскими ооцитами кошачьих этого до последнего времени никак не удавалось. В яйцеклетках этих животных липидных гранул еще больше, чем в эмбрионах. Однако недавно было показано, что если жировые капли из ооцитов кошек удалить, их «заморозка» осуществима (два года назад даже были получены первые котята после криоконсервации яйцеклеток домашней кошки). «Известно, что есть корреляция между количеством липидных капель в эмбрионах и яйцеклетках и их способностью выдерживать криоконсервацию, но вопрос о том, как жиры приводят к гибели клеток, до сих пор остаётся открытым», – сообщают исследователи.

При обычных температурах липиды биологических объектов находятся в так называемом «флюидном» состоянии, необходимом для нормального функционирования клетки, а при понижении градуса переходят в более упорядоченное, которое способно приводить к нарушению биологических процессов. «По спектрам комбинационного рассеяния света мы способны определить, в каком фазовом состоянии у нас находятся липиды эмбрионов. Если в обычных условиях их гидрофобные хвосты ведут себя хаотично, то в замороженном упорядоченном состоянии они выпрямляются и их спектр меняется, – говорит Константин Окотруб. – Если мы поймём как изменение свойств липидов клетки связано с другими факторами, то станет яснее, какую стратегию замораживания яйцеклеток или эмбриона того или иного объекта нужно выбрать, чтобы оно прошло успешно».

«Мы считаем, что комбинационное рассеяние света – уникальный метод по сравнению с тем, что сейчас используется: он бесконтактный, в отличие от других не вносит в эмбрион никаких посторонних веществ. Не меняя ситуацию, мы можем с высоким пространственным разрешением посмотреть, что происходит в разных местах эмбриона. Несколько задач Константин решил, но число нерешённых пока большое, и это поддерживает наш энтузиазм», – добавляет Николай Суровцев.

Диана Хомякова

Фото предоставлены [ИИЭ СО РАН](#)

Источники:

[В бережных объятиях холода](#) – Наука в Сибири (sbras.info), 16 мая 2016.

[Криоконсервация: в бережных объятиях холода](#) – Новости сибирской науки (sib-science.info), 16 мая 2016.

[В бережных объятиях холода](#) – Наука в Сибири (sbras.info), № 19 (3030), с. 5, 19.05.2016

[В бережных объятиях холода](#) – Академгородок (academcity.org), Новосибирск, 20 мая 2016.