

но и на получение прибыли. Пренебрежение этим фактом в конечном счете приведет к ухудшению качества лекарственного обеспечения.

В данной статье автор сделал попытку разработать модели регулирования цен на лекарственные препараты с учетом интересов не только пациентов, но также и участников каналов распределения. По мнению автора, обеспечение гарантированной доходности дистрибутора и аптеки позволит повысить качество лекарственного обеспечения за счет отсутс-

твия вымывания из аптек недорогих препаратов.

Мы надеемся, что полученные нами результаты окажутся интересными для специалистов по экономике здравоохранения и лекарственного обеспечения – как теоретиков, так и практиков.

### Литература

1. Матвеева А. Лечить будет нечем, но цены снижаются / А. Матвеева //Эксперт. – 2009. – №48. (685). Доступно онлайн по адресу: [http://www.expert.ru/printissues/expert/2009/48/lechit\\_budet\\_nechem/](http://www.expert.ru/printissues/expert/2009/48/lechit_budet_nechem/).

Matveeva A. No medicines, but prices will go down.//Ekspert, 2009, # 48 (685). Available online at: [http://www.expert.ru/printissues/expert/2009/48/lechit\\_budet\\_nechem/](http://www.expert.ru/printissues/expert/2009/48/lechit_budet_nechem/).

2. Юргель Н.В. ДЛО-ОНЛС, «7 нозологий», а что дальше / Н.В. Юргель, Е.А. Тельнова //Ремедиум. Информация для специалистов в области здравоохранения, 16.03.2009. Доступно онлайн по адресу [http://www.remedium.ru/section/detail.php?ID=23959&phrase\\_id=1140854](http://www.remedium.ru/section/detail.php?ID=23959&phrase_id=1140854).

Yurgel N. V., Telnova E. A. DLO-ONLS, "7 nozologies", what else?//Remedium. Information for specialists of public health, 16.03.2009. Available online at: [http://www.remedium.ru/section/detail.php?ID=23959&phrase\\_id=1140854](http://www.remedium.ru/section/detail.php?ID=23959&phrase_id=1140854).

## ТОЧКА ЗРЕНИЯ

Н.Г. Ли

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДЛИТЕЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ (ТКАНЕЙ, КЛЕТОК, ОРГАНОВ) С СОХРАНЕНИЕМ ИХ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 595.7: 591.54

Одним из подходов решения проблемы токсичности искусственных криопротекторов, применяемых при криоконсервировании биологических объектов, может быть их совместное использование с природными криопротекторными системами, вырабатываемыми холодоустойчивыми организмами Якутии, в частности насекомыми. Положительный опыт по использованию комплексных природных систем был получен в исследованиях по влиянию экстракта зимних гусениц *Aporia crataegi* L. на криоконсервирование лимфоцитов крови человека, которые выявили стабилизирующий эффект при многократных циклах замораживания-оттаивания клеток.

**Ключевые слова:** криоконсервация, криопротектор, токсичность, лимфоциты, холодоустойчивые насекомые, *Aporia crataegi* L..

One of the approaches to dissolve the problem of the toxicity of artificial cryoprotectors that have been applied in the cryopreservation of biopsies can be using it together with natural cryoprotectors, produced by cold hardy organisms, such as insects. The positive results were received in the studies on using of extract of overwintering caterpillars *Aporia crataegi* L. in the cryopreservation of human lymphocytes. The extract seems to be an efficient stabilizer at multiply cycles of freezing – thawing.

**Keywords:** cryopreservation, cryoprotector, toxicity, lymphocytes, cold hardy insects, *Aporia crataegi*.

Холод оказывает двоякое воздействие на живые организмы: с одной стороны, он может явиться причиной необратимых деструкций организма, приводящих к его гибели, с другой – предохраняет его от разрушений путем перевода на более низкий уровень биохимической активности. Оба эти процессы имеют место в природе. Гибель организма от воздействия низких температур является хорошо известным явлением. Пойкилотермные организмы и некоторые виды теплокровных животных, обитающих в экстремально холодных условиях, эволюционно выработали устойчивость к низким температурам. Посредством таких механизмов, как гибернация и

диапауза, они реализуют различные физиологические и молекулярные реакции, лежащие в основе их холодовой адаптации.

В практической криобиологии используются значительно более низкие температуры по сравнению с теми, которые наблюдаются в природе. Экстремальный холод жидкого азота, используемый в криобиологических манипуляциях, может разрушить живую ткань за считанные минуты. В то же время посредством определенной техники он способен сохранить ее в течение очень продолжительного времени без существенно видимой биохимической активности. Выяснение механизмов, посредством которых холод эффективно сохраняет живые ткани и органы, составляет основу современной криобиологии [6].

Как известно, повреждение клеток в процессе замерзания вызвано образо-

ванием как клеточных, так и внеклеточных кристаллов льда, что приводит к повышению концентрации солей [8,9], являющейся в конечном итоге причиной клеточного коллапса.

Путем ускорения процесса замерзания некоторые деструктивные последствия могут быть модифицированы, но тем не менее большинство из них будут доминировать. Чтобы предотвратить дегидратацию, вызванную замерзанием воды, необходимы агенты, способные связывать свободную воду и понижать температуру замерзания среды. В природе такими агентами являются криопротекторы полиольной природы. Наиболее распространенный среди них - глицерол; он также широко используется в целях лабораторной криоконсервации [1].

Криопротекторы оказывают различное воздействие на клетки. Одни из них обеспечивают коррекцию их осмо-

тического состояния за счет снижения концентрации накапливающихся при замерзании воды электролитов [10]. Другие, локализуясь во внеклеточном пространстве, активизируют потерю воды клетками, таким образом предотвращая образование внутриклеточного льда при высоких скоростях охлаждения. Глицерин и сахароза предотвращают денатурацию белка в замерзающем растворе [11]. Криопротекторами могут быть как низкомолекулярные вещества (глицерол, ДМСО, полиэтиленгликоль и др.), так и высокомолекулярные полимеры (напр. антифризные белки) [12]. Одним из важных параметров, определяющих эффективность криопротектора, является количество воды, которое он способен связать

Антифризные белки подавляют рост льда и его рекристаллизацию при оттаивании [13]. Они также повышают энергетический барьер гомогенной нуклеации [14].

В настоящее время используется довольно широкий спектр криопротекторных агентов, однако у каждого типа криопротектора свой уровень токсичности и клетки также очень неоднородны по своей чувствительности к нему. Токсичность имеет химическую или осмотическую природу. Некоторые криопротекторы могут непосредственно воздействовать на внутриклеточные органеллы, при этом их токсичность будет зависеть от силы взаимодействия полярной части молекулы с водой [2]. Поэтому для каждого типа тканей или клеток исследователь вынужден подбирать методом проб и ошибок условия замораживания и тип криопротектора. Это обусловлено тем, что до сих пор не найдено полного и удовлетворительного объяснения механизма действия криопротекторов.

Низкая токсичность и хорошая проницаемость - наиболее важные свойства этих веществ, определяющих их эффективность. По этой причине важной стадией криоконсервации является оценка равновесной точки между защитной эффективностью криопротектора и толерантностью клеток, которые будут заморожены, к его токсическому эффекту [15]. Поэтому вовлечение новых криопротекторных агентов в криобиологические исследования является одним из актуальных направлений низкотемпературной криоконсервации, с которым связаны в настоящее время надежды по выявлению наиболее перспективных веществ, имеющих значение для глобального решения данной проблемы.

Одно из привлекательных направлений исследований в данном аспекте, по нашему мнению, представляют знания в области изучения хладоустойчивости организмов, обитающих в холодных регионах нашей планеты.

#### **Природная криоконсервация.**

Для многих живых организмов, обитающих при экстремально низких зимних температурах, способность выдерживать замерзание жидкости тела является необходимой частью их существования.

Природная морозотolerантность известна для таких организмов, как полярные рыбы, наземные амфибии и рептилии, различные виды насекомых как Южного так и Северного полушарий. Все эти организмы выработали стратегии, которые позволяют им справиться с проблемой образования льда при низких температурах. Насекомые представляют собой обширную группу пойкилотермных организмов, выживающих при низких температурах благодаря 2 основным фундаментально различным стратегиям: морозотolerантность и избегание замерзания [13], которые основаны на процессе инициирования льдообразования во внеклеточной среде при высоких субнулевых температурах в первом случае и избегании замерзания путем глубокого переохлаждения – во втором. Одним из важных компонентов стратегии морозотolerантности являются льдонулепиращие белки, которые обеспечивают контролируемое внеклеточное льдообразование при температурах выше температуры кристаллизации внутриклеточной воды. Для компенсации осмотических эффектов такие насекомые продуцируют полиолы (глицерол, сорбитол, тритол, полиэтиленгликоль и др.). Некоторые насекомые, например *Upis ceramboides*, очень чувствительны к скорости охлаждения [16]. Для полного развития морозотolerантности им требуется скорость ниже 0,3°C/мин. Даже повышение скорости охлаждения до 0,35°C/мин резко увеличивает смертность этих насекомых при -50°C. Возможно, этой особенностью в морозотolerантности данных жуков можно объяснить их высокую смертность в Центральной Якутии (до 50%), которая была отмечена нами зимой 2002-2003 гг., когда температура воздуха в декабре и январе месяце достигала -50°C и ниже в течение более 1 месяца [4].

Морозоизбегающие насекомые удаляют все нуклеирующие агенты, которые способны вызвать спонтанное льдообразование в их организме. Они

вырабатывают значительные концентрации полиолов, главным образом, глицерол, что понижает температуру их замерзания, а также продуцируют антифризные белки, стабилизирующие переохлажденное состояние и предотвращающие инокуляцию льда из внешней среды [13].

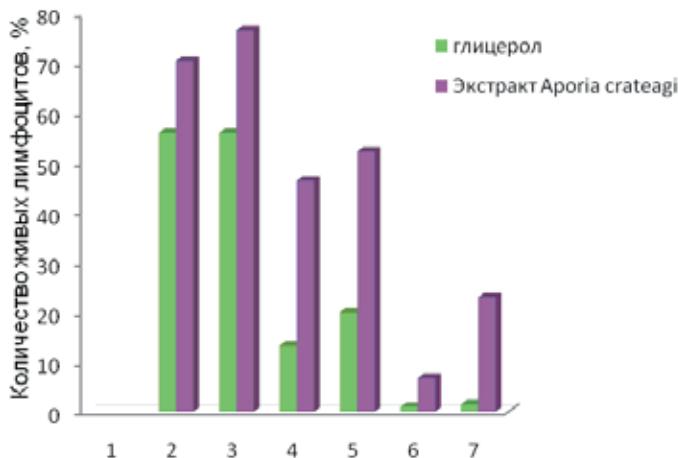
Криопротекторные соединения являются важным компонентом основных хладоадаптивных стратегий, позволяющих насекомым быть устойчивым даже к температурам жидкого азота (-196°C) [17]. Значение использования результатов по изучению хладоустойчивости насекомых в целях криоконсервации этой группы организмов ранее обсуждалось авторами [7]. В литературе описаны успешные эксперименты по криоконсервации насекомых в жидком азоте. Положительные результаты, например, были получены при замораживании гусениц кукурузного мотылька в диапаузе [6].

Насекомые Якутии являются интересным объектом изучения комплексных криопротекторных систем, выполняющих функцию сохранения жизни этих организмов в условиях экстремального климата данного региона [3]. Как показали исследования, насекомые могут продуцировать довольно специфические криопротекторные соединения. В частности, обнаружение треитола в гемолиде жука *Upis ceramboides* (Аляска) продемонстрировало новое вещество, обладающее криобиологическими свойствами [16]. В недавних исследованиях этого вида впервые обнаружен антифриз небелковой природы, так называемый ксиломаннан, состоящий из углевода и жирной кислоты, который локализуется внутри клеток у аляскинского *Upis ceramboides* [18]. Независимые исследования этого вида [4, 18] показали, что его толерантность к супернизким температурам превышает потребности, которые возникают при адаптации к природным температурам. Эти результаты позволяют нам предположить, что насекомые как наиболее пластичные в адаптационном отношении организмы продуцируют широкий спектр соединений, участвующих в криопroteкции их организма в зимний период, которые пока остаются неизвестными для исследователей. Именно по этой причине углубленные и систематические исследования природных криопротекторных агентов представляются нам весьма перспективным и многообещающим направлением.

Раннее нами было показано, что экстракт зимних гусениц *Aporia crataegi*

**Количественное содержание компонентов, входящих в состав экстракта *Aporia crataegi* L.**

Количество исследуемого криопротектора, взятого для ТСХ, мг	Количественное содержание полученных в ходе ТСХ отдельных компонентов экстракта (определен весовым методом)							
	глицерол		$\alpha$ -каротин		амины		неидентифицированные соединения	
	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%
108,7 ± 0,2	45,5 ± 0,46	42,0	2,4 ± 0,31	2,2	39,6 ± 0,24	36,4	21,2 ± 0,1	19,4



Количество живых лимфоцитов крови человека (%), замороженных в присутствии экстракта *Aporia crataegi* L. и глицерина: 2,4,6 – оба криопротектора взяты в концентрации 5%; 3,5,7 – оба криопротектора взяты в концентрации 16%; 2 и 3 – I замораживание; 4 и 5 – II замораживание; 5 и 6 – III замораживание

*L. (Lepidoptera)*, в составе которого были обнаружены три основных компонента: глицерол (45,5%), каротин (2,4%) и пептид неидентифицированной структуры (39,6%), проявляет криопротекторный эффект в отношении лимфоцитов крови человека при замораживании до -25°C (таблица) [5]. Сравнение экстракта насекомых с глицерином показало, что в концентрации 16% он дает наилучшие результаты. Экстракт проявляет выраженный стабилизирующий эффект при многократных циклах замораживания – оттаивания клеток. Как видно на рисунке, 16%-й экстракт оказывает лучший эффект при трехкратном замораживании лимфоцитов (более чем в 3 раза) в сравнении с глицерином, взятым в эквивалентной концентрации.

*Aporia crataegi* L. является морозотolerантным видом, холодовая адаптация которого основана на продукции льдонуклеирующих белков, обеспечивающих контролируемое льдообразование при -7°C и синтезе глицерина (до 1.24 М в гемолимфе) [3]. В настоящее время механизмы, лежащие в основе криопroteкции лимфоцитов при использовании экстракта данного вида, неизвестны. Выявление факторов, от-

ственных за стабилизацию лимфоцитов при многократных циклах замораживания-оттаивания, требует развития определенных экспериментальных подходов. Мы предполагаем, что каротины играют важную роль при реактивации лимфоцитов после многократных циклов замораживания – оттаивания. О важной роли антиоксидантов в сохранении кле-

### Литература

- Белоус А.М. Криоконсерванты / А.М. Белоус, М.И. Шраго, Н.С.Пушкиарь. – Киев: Наук. думка, 1979. – 200с.
- Belous A.M. Cryoconservants / A.M. Belous, M.I. Shrago, N.S. Pushkar. – Kiev: Nauk. Dumka, 1979. – 200 p.
- Жмакин А.И. Физические основы криобиологии / А.И. Жмакин // Успехи физических наук.- 2008.- V. 178. – № 3. - С. 243-266.
- Zjmakin A.I. The physical basics of cryobiology / Zjmakin A.I. // The Successes of Physical Sciences. - 2008. – V. 178. – № 3. - С. 243 – 266.
- Ли Н.Г. Механизмы адаптации насекомых к экстремальным климатическим условиям Якутии/ Н.Г. Ли // Научный отчет РФФИ, проект № 06-04-96048.- 2008. - 12 с.
- Li N.G. The adaptation mechanisms of insects to extreme climatic conditions of Yakutia / N.G. Li // Scientific Report RFFI, the project № 06-04-96048.- 2008. - 12 p.
- Ли Н.Г. Экофизиологические особенности адаптации жуков *Upis cerambooides*, обитающих в Центральной Якутии / Н.Г. Ли // Ж. Проблемы криобиологии.- 2006. - № 3.- V. 16. - С. 310-317.
- Li N.G. Ecophysiological peculiarities of adaptation for beetles *Upis cerambooides* inhabiting Central Yakutia / N.G. Li // J. The problems of cryobiology. – 2006. – № 3. –V. 16. – P. 310 – 317.
- Пат. 2178463 Российская Федерация, МКИ 7 C 12 N 5/00. Природный криопротектор / Н.Г. Ли, В.Л. Осаковский, С.С. Иванова (Россия). - № 99114892/139015717; заявл. 09.07.1999; опубл. 20.01.2002. Бюл. № 2 – 4 с.
- Patent 2178463 Russian Federation, MKI 7 C 12 N 5/00. Natural cryoprotector / N.G. Li., V.L. Osakovsky, S.S. Ivanova (Russia). - № 99114892/139015717; accept. 09.07.1999; publ. 20.01.2002. Bul. № 2 – 4 p.
- Лозино-Лозинский Л. К. Очерки по криобиологии / Л.К. Лозино-Лозинский. – Л.: Академия наук СССР, 1972. - 287 с.
- Lozino-Lozinsky L.K. Cryobiology / L.K. Lozino-Lozinsky. – Leningrad: Academy of Sciences USSR, 1972. - 287 p.
- Четверикова Е.П. Некоторые адаптации насекомых к низким температурам и проблемы их криоконсервации / Е.П. Четверикова // Биофизика живой клетки. – 1994. - № 6. - С. 34-39.
- Chetverikova E. P. Some adaptations of insects to low temperatures and the problem of their cryoconservation / E.P. Chetverikova // Biophysics of alive cell. – 1994. - N6. – P. 34-39.
- Ловелок Дж.Е. The Mechanism of the Protective Action of Glycerol against Haemolysis by Freezing and Thawing/ Lovelock JE // Biochim Biophys Acta. – 1953. - V. 11. - P. 28 – 36.
- Мерьяман Н. Т. Cryoprotective agents / H. T. Meryman // Cryobiology. -1971- V. 8. - P. 172.
- Ероглу А. Поступательное удаление инъецированного тrehalose при развитии мышиных эмбрионов / А. Ероглу // Reproducriv Biomedicine Online. – 2005. – V. 10. - N4. - P. 503-510.
- Страмбини Дж.Б. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding / J.B. Strambini, E. Gabellini // Biophys. J. – 1996. - V. 70. - P. 971.
- Думан Дж.Г. Adaptations of insects to subzero temperature/ J.G. Duman, Wu Ding Wen, Xu Lei Tursman, Donald and Olsen Mark T// The Quart. Rev. of Biol. – 1991. - V. 66. - № 4. – P. 387-407.
- Зачариассен К.Е. Physiology of cold tolerance in insects / K.E. Zachariassen // Physiol. Rev. – 1985. - V. 65. - P. 799-832.
- Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) / C.H. Cheng ; Ed. S Gerday. – London: EOLSS Pub, 2003. - P. 438.
- Чао Н.Н. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos / N.H. Chao, C. Liao // Aquaculture. - 2001. - V. 197. - P. 161-189.
- Miller L.K. Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance / L.K. Miller, J.S. Smith // Nature. - 1975. - V. 258. - P. 519-520.
- Асахина Е. The freezing process of frost hardy caterpillars / E. Asahina, K. Aoki, J. Shinozaki // J. Bul. Ent. Res. - 1954. - V. 45. - P. 329-339.
- Уортерс К.Р. Jr. A nonprotein thermal hysteresis-producing xylomannan antifreeze in the freeze-tolerant Alaskan beetle *Upis cerambooides* /K.R., Walters, A.S. Serianni, T. Sforza, B.M. Barnes, J.G. Duman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. - 106(48).- P. 202-205.
- Мотта Р.Р. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide / P.R. Motta, B.E. Gomes, L.F. Bouzas, F.H. Paraguassú-Braga and L.C. Porto // Cryobiology. – 2010. – V. 60. - P. 301-307.