

УДК 577.29

БИОХИМИЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ КЛЕТОК: ПРОЦЕССЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ И ХРАНЕНИИ КЛЕТОК

Шамитова Е.Н., Валеева Д.Т., Никифорова У.А.

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова (ЧГУ им. И.Н. Ульянова)

428015, Чебоксары, Московский пр-т, д. 15, Российская Федерация

Актуальность. Исследование биохимических механизмов замораживания клеток представляет собой актуальную научную задачу, имеющую фундаментальное и прикладное значение. Процесс криоконсервации сопряжен с рядом критических проблем, требующих детального изучения: формирование внутри- и внеклеточного льда, осмотический стресс, фазовые переходы в липидных мембранах. Особую значимость приобретает разработка эффективных криопротекторов и оптимизация их применения, а также изучение роли антифризных белков в защите клеточных структур при низких температурах.

Цель – систематизировать и критически проанализировать современные знания о молекулярных и клеточных механизмах, лежащих в основе процессов замораживания и криоконсервации клеток, с акцентом на биохимические изменения и адаптационные реакции клеток.

Материалы и методы. Проведен поиск литературы в электронных базах данных PubMed, Scopus и Web of Science, MEDLINE. Ключевые слова для поиска включали: «CRYOBIOLOGY», «CELL FREEZING», «CRYOPRESERVATION», «BIOCHEMISTRY OF FREEZING», «CELL STORAGE». Временной диапазон охватывал период с 1980 по 2024 года, что позволило проследить эволюцию представлений о процессах, происходящих при замораживании клеток.

Результаты. В ходе проведенного исследования были систематизированы и обобщены ключевые аспекты биохимических механизмов замораживания клеток. Анализ литературных данных подтвердил, что основными факторами повреждения клеточных структур при криоконсервации являются образование кристаллов льда и окислительный стресс, вызванный свободными радикалами.

Заключение. Криоконсервация биологических материалов представляет собой динамично развивающуюся область, имеющую фундаментальное значение для современной биотехнологии и медицины. Проведенный анализ современных подходов к замораживанию и размораживанию биологических образцов позволяет сделать следующие выводы. Автоматизированные системы, такие как SMARTNAW, демонстрируют значительные преимущества перед традиционными методами, обеспечивая стандартизацию процессов, снижение рисков контаминации и повышение воспроизводимости результатов. Углубление понимания молекулярных и клеточных механизмов криоповреждений, включая структурно-функциональные изменения мембран, окислительный стресс и апоптотические пути, создает основу для разработки более эффективных протоколов криоконсервации. Дальнейшее развитие методов криоконсервации требует междисциплинарного подхода, объединяющего достижения в области биофизики, клеточной биологии, материаловедения и инженерии.

Ключевые слова: криобиология, криоконсервация, криопротекторы, витрификация, осмотический стресс, апоптоз, окислительный стресс, криоповреждение, хранение клеток.

Шамитова Елена Николаевна – к.б.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, «ЧГУ им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары. ORCID ID: 0000-0002-4642-7822. E-MAIL: SHAMITVA@MAIL.RU.

Валеева Диана Тагировна – студентка 2 курса медицинского факультета «ЧГУ им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары. ORCID ID: 0009-0000-0281-5148. E-MAIL: DIANA21V@MAIL.RU. (автор, ответственный за переписку).

Никифорова Ульяна Алексеевна – студентка 2 курса медицинского факультета «ЧГУ им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары. ORCID ID: 0009-0005-0844-1948. E-MAIL: ULYANCHIK.20@GMAIL.COM.

УДК 577.29

BIOCHEMISTRY OF CELL FREEZING: PROCESSES OCCURRING DURING FREEZING AND STORAGE OF CELLS

SHAMITOVA E. N., VALEEVA D. T., NIKIFOROVA U. A.

CHUVASH STATE UNIVERSITY NAMED AFTER I.N. ULYANOV (CHSU NAMED AFTER I.N. ULYANOV)

428015, 15, MOSKOVSKY PROSPECT, CHEBOKSARY, RUSSIAN FEDERATION

RELEVANCE. THE STUDY OF BIOCHEMICAL MECHANISMS OF CELL FREEZING REPRESENTS AN URGENT SCIENTIFIC TASK WITH BOTH FUNDAMENTAL AND APPLIED SIGNIFICANCE. THE CRYOPRESERVATION PROCESS IS ASSOCIATED WITH A NUMBER OF CRITICAL ISSUES REQUIRING DETAILED EXAMINATION: FORMATION OF INTRA- AND EXTRACELLULAR ICE, OSMOTIC STRESS, PHASE TRANSITIONS IN LIPID MEMBRANES. OF PARTICULAR IMPORTANCE IS THE DEVELOPMENT OF EFFECTIVE CRYOPROTECTANTS AND OPTIMIZATION OF THEIR APPLICATION, AS WELL AS THE STUDY OF THE ROLE OF ANTIFREEZE PROTEINS IN PROTECTING CELLULAR STRUCTURES AT LOW TEMPERATURES.

OBJECTIVE: TO SYSTEMATIZE AND CRITICALLY ANALYZE CURRENT KNOWLEDGE ABOUT MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS UNDERLYING THE PROCESSES OF CELL FREEZING AND CRYOPRESERVATION, WITH EMPHASIS ON BIOCHEMICAL CHANGES AND ADAPTIVE RESPONSES OF CELLS.

MATERIALS AND METHODS. A LITERATURE SEARCH WAS CONDUCTED IN ELECTRONIC DATABASES INCLUDING PUBMED, SCOPUS, WEB OF SCIENCE, AND MEDLINE. SEARCH KEYWORDS INCLUDED: «CRYOBIOLOGY», «CELL FREEZING», «CRYOPRESERVATION», «BIOCHEMISTRY OF FREEZING», «CELL STORAGE». THE TIME RANGE COVERED THE PERIOD FROM 1980 TO 2024, WHICH ALLOWED FOR TRACKING THE EVOLUTION OF UNDERSTANDING ABOUT PROCESSES OCCURRING DURING CELL FREEZING.

RESULTS. DURING THE CONDUCTED RESEARCH, KEY ASPECTS OF BIOCHEMICAL MECHANISMS OF CELL FREEZING WERE SYSTEMATIZED AND SUMMARIZED. ANALYSIS OF LITERATURE DATA CONFIRMED THAT THE MAIN FACTORS DAMAGING CELLULAR STRUCTURES DURING CRYOPRESERVATION ARE ICE CRYSTAL FORMATION AND OXIDATIVE STRESS CAUSED BY FREE RADICALS.

CONCLUSION. CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL MATERIALS REPRESENTS A DYNAMICALLY DEVELOPING FIELD THAT HAS FUNDAMENTAL IMPORTANCE FOR MODERN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE. THE CONDUCTED ANALYSIS OF CONTEMPORARY APPROACHES TO FREEZING AND THAWING BIOLOGICAL SAMPLES ALLOWS US TO DRAW THE FOLLOWING CONCLUSIONS. AUTOMATED SYSTEMS, SUCH AS SMARTTAW, DEMONSTRATE SIGNIFICANT ADVANTAGES OVER TRADITIONAL METHODS, PROVIDING STANDARDIZATION OF PROCESSES, REDUCING CONTAMINATION RISKS, AND INCREASING THE REPRODUCIBILITY OF RESULTS. DEEPENING THE UNDERSTANDING OF MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF CRYODAMAGE, INCLUDING STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN MEMBRANES, OXIDATIVE STRESS, AND APOPTOTIC PATHWAYS, CREATES A FOUNDATION FOR DEVELOPING MORE EFFECTIVE CRYOPRESERVATION PROTOCOLS. FURTHER DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION METHODS REQUIRES AN INTERDISCIPLINARY APPROACH, COMBINING ACHIEVEMENTS IN BIOPHYSICS, CELL BIOLOGY, MATERIALS SCIENCE, AND ENGINEERING.

KEYWORDS: CRYOBIOLOGY, CRYOPRESERVATION, INTRACELLULAR ICE FORMATION, CRYOPROTECTANTS, OSMOTIC STRESS, VITRIFICATION, APOPTOSIS, MEMBRANE STABILITY, OXIDATIVE STRESS, CRYOINJURY, STORAGE OF CELLS.

SHAMITOVA ELENA N. – CANDIDATE OF BIOLOGICAL SCIENCES, ASSISTANT PROFESSOR OF DEPARTMENT PHARMACOLOGY, CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOCHEMISTRY, CHSU NAMED AFTER I.N. ULYANOV, CHEBOKSARY, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0000-0002-4642-7822. E-MAIL: SHAMITVA@MAIL.RU.

VALEEVA DIANA T. – 2 YEAR STUDENT OF THE OF THE FACULTY OF MEDICINE, CHSU NAMED AFTER I.N. ULYANOV, CHEBOKSARY, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0000-0281-5148. E-MAIL: DIANA21V@MAIL.RU. (THE AUTHOR RESPONSIBLE FOR THE CORRESPONDENCE).

NIKIFOROVA ULYANA A. – 2 YEAR STUDENT OF THE FACULTY OF MEDICINE, CHSU NAMED AFTER I.N. ULYANOV, CHEBOKSARY, RUSSIAN FEDERATION. ORCID ID: 0009-0005-0844-1948. E-MAIL: ULYANCHIK.20@GMAIL.COM.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Биохимический механизм замораживания клеток – это сложный процесс, включающий в себя множество факторов. Формирование льда – это ключевая проблема при криоконсервации. Внутриклеточное образование льда может разрушать клеточные структуры, в то время как внеклеточный лед может вызывать механическое повреждение клеток. Контроль формирования льда критически важен для успешной криоконсервации.

Следующий фактор – это осмотический стресс: при замораживании и оттаивании клетки подвергаются значительным осмотическим изменениям. Это может привести к резким изменениям объема клетки, повреждению мембран и нарушению внутриклеточного баланса. Управление осмотическим стрессом – важная задача для сохранения жизнеспособности клеток [1].

Важную роль в процессе замораживания клеток несут криопротекторы: эти вещества помогают защитить клетки от повреждений при замораживании. Однако их применение сопряжено с рядом проблем: подбор оптимальных концентраций и комбинаций, потенциальная токсичность при высоких концентрациях, необходимость обеспечения проникновения через клеточные мембраны, удаление криопротекторов после размораживания. Антифризные белки играют важную роль в криобиологии и замораживании клеток. Эти специализированные белки могут помочь в контроле образования льда. Проблемы включают: ограниченную доступность и высокую стоимость, сложность определения оптимальных концентраций и методов применения, потенциальное взаимодействие с другими компонентами криозащитных сред. Низкие температуры могут вызывать фазовые переходы в липидах мембран, что приводит к изменениям в липидном составе мембраны: изменению текучести мембран, нарушению функций мембранных белков, потенциальному разрыву мембран при размораживании [1, 2].

Криоконсервация клеток играет ключевую роль в сохранении стволовых клеток, тканей и органов для трансплантации. Понимание биохимических процессов замораживания позволит улучшить методы хра-

нения и повысить эффективность применения клеточных технологий в лечении различных заболеваний. Криобиология и биохимия замораживания клеток – это обширные области исследований, которые охватывают процессы, происходящие при низкотемпературной консервации биологических материалов. Основное внимание уделяется изучению механизмов, которые позволяют клеткам выживать при экстремально низких температурах, а также разработке методов, улучшающих сохранность и функциональность клеток после оттаивания. В условиях глобального изменения климата и сокращения популяций редких видов, криоконсервация генетического материала становится важным инструментом сохранения биоразнообразия. Изучение процессов замораживания клеток различных видов поможет разработать эффективные методы долгосрочного хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен поиск литературы в электронных базах данных PubMed, Scopus и Web of Science, MEDLINE. Ключевые слова для поиска включали: «CRYOBIOLOGY», «CELL FREEZING», «CRYOPRESERVATION», «BIOCHEMISTRY OF FREEZING», «CELL STORAGE». Временной диапазон охватывал период с 1980 по 2024 года, что позволило проследить эволюцию представлений о процессах, происходящих при замораживании клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Решение проблем криобиологии и биохимии замораживания клеток требует междисциплинарного подхода, в нашей работе мы хотели бы обобщить существующие исследования и знания по данной теме.

При замораживании клеток основной проблемой является образование кристаллов льда, которые могут вызывать механические повреждения клеточных структур. Свободные радикалы образуются в процессе метаболизма клетки и при воздействии физико-химических факторов внешней среды. Поиск веществ, которые проявляют ингибирующие свойства в про-

-цессах окисления, предотвращающие необратимые изменения в структуре белков, нуклеиновых кислот и в конечном итоге гибели клетки, является ещё одной не решенной проблемой криоконсервации. В последнее время внимание исследователей было сосредоточено на выявлении натуральных растительных соединений с высокой биологической активностью, в том числе антиоксидантными, противовоспалительными и противомикробными, которые возможно использовать для профилактики и контроля ряда заболеваний [3].

«Двухфакторная гипотеза о замораживании» обсуждаемая в исследовании проведенном MAZUR ET AL. (2005) подтверждает критическое влияние скорости охлаждения в определении размера и расположения этих кристаллов. Целью данного исследования было изучение механизмов повреждения клеток при замораживании и проверка гипотезы о двух факторах, влияющих на выживаемость клеток в процессе криоконсервации. При анализе существующей литературы и исследований в области криоконсервации тканей, рассматривая различные аспекты процесса, включая: физические и химические процессы при замораживании тканей, методы криоконсервации (медленное замораживание и витрификация), использование криопротекторов, проблемы, связанные с размером и сложностью тканей, методы оценки жизнеспособности тканей после размораживания выявлены основные проблемы процесса криоконсервации тканей: неравномерное распределение криопротекторов в ткани, формирование льда и механические повреждения, осмотический стресс и химическая токсичность криопротекторов, трудности с равномерным охлаждением и нагревом крупных образцов тканей [14].

Объектом исследования MAZUR ET AL. (2005) являлась культура клеток китайского хомячка. Методы замораживания: использовались различные скорости охлаждения (от 0,5°C/мин до 1000°C/мин). В качестве криопротектора применялись различные концентрации глицерина (0-2 M). При оценке выживаемости использовался метод клонирования для определения способности клеток к делению после размораживания. При дальнейшей микроскопии наблюдали за формированием внут-

риклеточного льда. В результате данного исследования была выявлена U-образная зависимость выживаемости клеток от скорости охлаждения. При низких скоростях охлаждения (менее 1°C/мин) основной причиной гибели клеток был осмотический стресс. При высоких скоростях охлаждения (более 10°C/мин) главным фактором повреждения было образование внутриклеточного льда. Оптимальная скорость охлаждения составила около 1°C/мин. Использование глицерина в качестве криопротектора повышало выживаемость клеток, особенно при высоких скоростях охлаждения [8].

Исследование Ващенко В.И. и др. (2015) посвящено изучению влияния процесса замораживания и оттаивания на клетки донорского и аутологичного костного мозга. Основное внимание уделено изменениям в спектре изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и метаболических процессах клеток после криоконсервации. Обнаружено смещение спектра изоферментов ЛДГ от М-форм к Н-формам после размораживания, что указывает на быстрое восстановление клеточного метаболизма. Выявлено значительное уменьшение содержания АТФ в размороженных клетках. Отмечено увеличение образования пировиноградной кислоты в размороженных клетках. Установлено, что криопротектор поливинилпирролидон (ПВП) обеспечивает лучшую сохранность клеток по сравнению с ПЭО-400. Обнаружена корреляция между структурными изменениями сверхспиральной ДНК и изменениями количества АТФ и пировиноградной кислоты во внеклеточной среде. Исследование демонстрирует важность изучения биохимических изменений в клетках костного мозга при криоконсервации для оптимизации методов их сохранения и использования в медицинских целях [1, 2, 4].

Изменения концентрации солей и других растворенных веществ в результате удаления воды в виде льда могут приводить к осмотическому стрессу. Так в своем исследовании KARLSSON AND TONER (1996) описывают, как формирование внеклеточного льда приводит к повышению концентрации растворенных веществ в оставшейся жидкой фазе, что вызывает осмотический стресс для клеток. Целью дан-

-ного исследования было рассмотрение критических вопросов, связанных с долгосрочным хранением тканей методом криоконсервации, и анализ основных проблем и перспектив в этой области [12].

В работе KARLSSON J. O (2001) рассмотрены преимущества и недостатки различных методов криоконсервации и выделены следующие значимые моменты: медленное замораживание более простое в реализации, но может вызывать образование льда. Витрификация: позволяет избежать образования льда, но требует высоких концентраций криопротекторов. Проанализированы перспективные направления исследований и предложена разработка новых криопротекторов с меньшей токсичностью, использование комбинаций криопротекторов и применение методов тканевой инженерии для улучшения криоконсервации [13].

Для оценки эффективности криоконсервации важно использовать комплексные методы анализа жизнеспособности и функциональности тканей после размораживания. Дальнейшие исследования в области криоконсервации тканей имеют большое значение для развития трансплантологии, регенеративной медицины и биоинженерии. FANU ET AL. (2004) объясняют, как криопротекторы, такие как глицерин или диметилсульфоксид (ДМСО), помогают предотвратить образование внутриклеточного льда и снизить осмотический стресс. Целью их исследования являлось разработка улучшенных растворов для витрификации на основе прогнозирования токсичности компонентов раствора. Они проводили анализ токсичности различных криопротекторов и их комбинаций. Разрабатывали математическую модель для прогнозирования токсичности растворов для витрификации. Тестировали новые растворы на клетках почек кролика. Оценивали эффективность витрификации и выживаемости клеток после размораживания. В ходе исследования разработана математическая модель для прогнозирования токсичности растворов для витрификации. Созданы новые растворы для витрификации с пониженной токсичностью: M22 (название M22 относится к минус 22 градусам Цельсия, то есть температуре, при которой полнопрочный раствор перфузируется в почки в опубликованных

экспериментах по криосохранению органов): основной улучшенный раствор, VM3 – криопротектор позволяет растворам и ячейкам в них охлаждать до температуры перехода ниже стекла без образования льда. Криопротектор VM3 содержит антизарождающие и ингибирующие рост льда растворные вещества, которые в значительной степени предотвращают образование льда даже во время повторного прогрева при температуре около 4°C/мин., это модификация M22 с меньшей вязкостью. Новые растворы показали лучшую выживаемость клеток по сравнению с ранее используемыми растворами. Достигнута витрификация образцов объемом до 1 мл без образования льда. Таким образом прогнозирование токсичности растворов для витрификации позволяет создавать более эффективные и менее токсичные составы. Новые растворы (M22 и VM3) обеспечивают лучшую защиту клеток при витрификации. Необходимы дальнейшие исследования для оптимизации составов растворов и расширения их применения на различные типы тканей и органов [12, 15].

В работе Одинцовой И.А и др (2021) рассматривается история возникновения и развития методов криоконсервации, с особым акцентом на преимущества метода витрификации. Авторы анализируют современные аспекты криоконсервации гамет, включая различные методики отбора полноценных половых клеток, протоколы проведения криоконсервации и характеристики используемых криопротекторов. Особое внимание уделяется механизмам криоповреждения и криозащиты при замораживании и витрификации, а также морфологическим изменениям, происходящим в половых клетках после процедуры замораживания и оттаивания. Представлены современные методики оценки жизнеспособности гамет до и после криоконсервации. Показано, что нарушение компактизации хроматина и фрагментация ДНК в морфологически не измененных спермиях оказывает негативное влияние и на качество эмбрионов, и на результаты ЭКО. Подчеркнуто преимущество структурно-функционального состояния ооцитов млекопитающих при криоконсервации в составе ооциткумулусных комплексов по сравнению с ооцитами, созревшими в культивационной среде без фолли-

-кулярного эпителия [5].

WOLKERSET AL. (2007) исследовали изменения в структуре и функции клеточных мембран при замораживании, включая фазовые переходы липидов и изменения в белковых структурах. Проводя с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR-анализ) выявили постепенное увеличение упорядоченности липидов мембран во время холодного хранения. Обнаружили снижение текучести мембран эритроцитов с увеличением времени хранения. Наблюдались морфологические изменения эритроцитов, включая образование эхиноцитов. С помощью флуоресцентной микроскопии было определено, что липидный зонд 1,1'-диокадецил-3,3,3',3'-тетраметил-индокарбоцианин перхлорат (DIL-C18) оставался однородным распределенным в эритроцитарной мембране во время холодного хранения, что говорит о том, что липидные домены были ниже предела разрешения микроскопа. С помощью тонкослойной хроматографии изменения в составе мембранных липидов были обнаружены во время холодного хранения. Напротив, оценка полосы амида-II с помощью FTIR показала, что общая белковая вторичная структура гемоглобина была стабильной во время холодного хранения. Выявили корреляция между структурными изменениями мембран и увеличением гемолиза [15].

BAUST ET AL. (2009, 2017) в своих исследованиях обсуждают роль окислительного стресса в повреждении клеток при замораживании и оттаивании, а также потенциальные стратегии для минимизации этого эффекта. Подчеркивают необходимость учета молекулярных и клеточных процессов при криоконсервации, важность молекулярных аспектов криоповреждения, выявляют ключевые механизмы повреждения клеток при замораживании и оттаивании, учитывая роль апоптоза и некроза в гибели клеток после криоконсервации. Предложили новые стратегии криозащиты: разработка многокомпонентных криопротекторных растворов, использование антиоксидантов и ингибиторов апоптоза для повышения выживаемости клеток. Ввели технологические инновации: применение контролируемого замораживания и витрификации, разработка

новых устройств и оборудования для криоконсервации [7, 15].

Жонн BAUST со своими коллегами предложил новую стратегию криозащиты: разработку многокомпонентных криопротекторных растворов, использование антиоксидантов и ингибиторов апоптоза для повышения выживаемости клеток [13].

В их исследовании при криоконсервации культуральная среда была заменена на свежую ростовую среду за 24 часа до замораживания. Монослой клеток был отделен добавлением TRYPLETМ (THERMO FISHER SCIENTIFIC) на 5 минут при 37°C. После 5-минутного инкубационного периода к клеточной суспензии добавляли 3 мл ростовой среды для ингибирования ферментативной диссоциации. Клеточная суспензия была разделена поровну и осаждена при 100×g в течение 5 минут. Супернатант был слит, а клеточный осадок ресуспендирован до концентрации 1×10^6 клеток/мл в различных растворах криопротекторов (КП) при 10°C. Используемые растворы КП были либо VIASPAN® (TEVA PHARMACEUTICALS), либо UNISOLТМ (TISSUE TESTING TECHNOLOGIES LLC), дополненные 5%, 10% или 15% ДМСО (SIGMA-ALDRICH). Перед использованием раствор UNISOL был дополнен 3 мМ глутатиона, как рекомендовано производителем. Клеточные суспензии затем помещали в криопробирки объемом 2 мл (1 мл/пробирку) и пакеты для замораживания CS 25 (25 мл/пакет) (ORIGEN BIOMEDICAL), замораживали по стандартному протоколу с контролируемой скоростью ~1°C в минуту до достижения -80°C, а затем хранили при температуре жидкого азота (LN₂) (-196°C) [10].

После хранения клетки быстро размораживали как в водяной бане при 37°C, так и в устройстве SMARTTNAW до исчезновения льда и охлаждения образцов (примерно 0-4°C). Проводили одноэтапное разбавление (1:12) в ростовой среде, затем 100 мкл клеточной суспензии пипетировали в отдельные лунки 96-луночного планшета для культивирования тканей (CELLTREAT) и культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂/95% воздуха) для восстановления и оценки. Ростовая среда обновлялась 24-часовыми интервалами для исследований выживаемости клеток [8].

Для оценки жизнеспособности клеток J. BAUST и группой исследователей использо-

-льтатом адаптации термодатчика к температуре образца и не влияет на размораживание образца. Данные о температуре могут быть записаны и сохранены с помощью пользовательского интерфейса на основе ПК (модуль сбора данных AZEOTECH DAQ FACTORY) в файле CSV. При желании данные можно экспортировать в EXCEL для последующего анализа. За 10 секунд до окончания запрограммированного интервала размораживания звучит сигнал, предупреждающий пользователя о необходимости извлечь образец. Эти функции обеспечивают платформу, которая отвечает разнообразным потребностям, условиям и совместимости с любым типом образцов или контейнеров, используемых для замораживания и хранения образцов. В этом исследовании проведена оценка скорости нагрева образца, жизнеспособность и восстановление после размораживания образца с помощью SMARTTNAW, и сравнение результатов с теми, которые были получены с использованием стандартного протокола водяной бани при 37 °C. Система SMARTTNAW с термодатчиками, установленными на 40 °C, смогла обеспечить скорость размораживания ~60°C/мин, что было сопоставимо со стандартным протоколом водяной бани. Дополнительные исследования также продемонстрировали возможность регулировать общую скорость размораживания с помощью SMARTTNAW путем увеличения или уменьшения температуры подушки для размораживания перед размораживанием образца (данные не показаны). Эта уникальная функция позволяет пользователю настраивать скорость размораживания (время) на основе индивидуальных параметров для оптимизации условий образца. Помимо стандартных криопробирок и 25 мл пакетов для замораживания, исследования, проведенные с пакетами для замораживания объемом 250, 500 и 1000 мл, показали улучшенные результаты размораживания по сравнению с теми, которые были получены с водяными банями. Это было достигнуто с помощью SMARTTNAW, обеспечивая при этом чистый, контролируемый и документируемый процесс, что невозможно при использовании протокола размораживания в водяной бане. Оценка жизнеспособности клеток после размораживания с использованием кле-

ток рака простаты и стволовых клеток человека показала схожие результаты выживаемости при использовании SMARTTNAW. Эта закономерность наблюдалась для различных средносителей и концентраций криопротекторных агентов. Последующая оценка популяций в течение 3-дневного периода восстановления после размораживания показала, что выжившие клетки также могли делиться в культуре с аналогичной или, в некоторых случаях, улучшенной скоростью восстановления при использовании SMARTTNAW. Эти данные демонстрируют высокую эффективность SMARTTNAW по сравнению со стандартным методом размораживания в теплой водяной бане, одновременно снижая несколько потенциальных факторов риска [8-10].

ВЫВОДЫ

На основании изучения и анализа современных источников литературы можно сделать вывод, что криоконсервация клеточных линий и микроорганизмов имеет огромное значение для производства биологически активных веществ, вакцин и лекарственных препаратов. Улучшение методов замораживания и хранения клеток может значительно повысить эффективность и снизить затраты в биотехнологической и фармацевтической отраслях.

Данные проведенного анализа показывают, что SMARTTNAW способен размораживать клетки в пробирках или пакетах для клеточной терапии и продемонстрировал свою потенциальную полезность в фундаментальных исследованиях, биопроцессинге клеток и клинических условиях. В отличие от водяной бани, SMARTTNAW также снижает риск загрязнения и минимизирует зависимость от оператора вариативность. Интегрированный мониторинг внешней термодатчика и регистрация температуры образца во время процесса размораживания были признаны дополнительным преимуществом. Сочетание обеспечения последовательного, автоматического, документируемого размораживания различных контейнеров для образцов, объемов и брендов производителей (пакеты для замораживания различных размеров, пробирки и ампулы, среди прочего) в чистой, сухой среде при обеспечении аналогичного или улучшенного

-вался анализ метаболической активности ALAMARBLUE™ (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Среду для культивирования клеток удаляли из 96-луночных планшетов и в каждую лунку добавляли 100 мкл рабочего раствора ALAMARBLUE (разведение 1:20 в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS)). Затем образцы инкубировали в течение 60 минут (± 1 минута) при 37°C в темноте. Уровни флуоресценции анализировали с помощью планшетного ридера SPECTRAFLUOR PLUS (TECAN). Относительные единицы флуоресценции преобразовывали в проценты по сравнению с нормотермическими контролями, принятыми за 100%, и данные графически отображали с помощью MICROSOFT EXCEL. Измерения жизнеспособности проводились через 1, 2 и 3 дня после восстановления. Во время интервала размораживания оценка температурных профилей образцов (внутренних и внешних) проводилась с использованием термодатчика типа Т ОМЕГА (ТД) и записывалась в режиме реального времени. Термические данные собирались с помощью системы ОМЕГА OMBDAQSCAN-2000 с модулем расширения OMB-DBK90. Система была настроена на частоту сбора данных 1 скан/сек для обеспечения сбора данных в реальном времени [10, 15].

Внутренние температуры образцов регистрировались с помощью ТД, помещенной в центр объема образца через жесткую иглу 19-го калибра, вставленную через порт доступа люэр в пакетах для замораживания ORIGEN, или через отверстие, просверленное в крышке криопробирки. ТД приклеивались на место в различных контейнерах для предотвращения просачивания LN₂ в образец [8].

Для образцов, размороженных с помощью SMARTTAW, температура образца также оценивалась с помощью интегрированной термодушки (пакетов для замораживания) или термочехла (для пробирок) облегчения неинвазивного мониторинга внешней температуры образца. Перед извлечением из LN₂ внутренние ТД образцов подключались к системе ОМЕГА, и термическая запись начиналась после помещения образцов в водяную баню при 37°C. Образцы осторожно перемешивали вручную на протяжении всего процесса размораживания [8, 9].

Размораживание с помощью SMART TNA

внутренняя ТД подключалась к системе ОМЕГА перед извлечением образца из LN₂, и начиналась запись. В отдельных циклах размораживания интегрированная термодушка размещалась в центре пакета с образцом, а термочехол прикреплялся к криопробирке перед помещением в подушку для размораживания.



Рис. 1. Система SMARTTAW

Настольное устройство для размораживания с контролируемой температурой содержит серию термонагревательных подушек в центральной части устройства (рис. 1) и может быть настроено на диапазон температур от комнатной (номинально 18°C) до 90°C с помощью электронного компьютерного пользовательского интерфейса. В данном исследовании использовалась рабочая температура подушек для размораживания 40°C (для пакетов для замораживания) и 55°C (для криопробирок). После установки желаемой температуры устройство нагревается путем активации термоэлектрического нагревателя, расположенного под подушками. Когда желаемая температура достигнута, система готова к использованию [8].

Таймер, интегрированный в рабочую программу, автоматически отслеживает время размораживания, которое обычно составляет от 2 до 5 минут в зависимости от объема образца и формы контейнера. На протяжении всего процесса температура образца контролируется с помощью интегрированной поверхностной термодушки. После начального 30-секундного периода уравнивания во время размораживания, температура образца отображается в режиме реального времени на протяжении оставшегося интервала размораживания. Эта задержка является резу-

-выживания и восстановления клеток свидетельствует о том, что SMARTNAW обеспечивает важное улучшение процессов криоконсервации. Учитывая разнообразие отраслей, которые полагаются на обработку и хранение биологических материалов для последующего использования, SMARTNAW может предоставить удобное устройство для размораживания для использования в таких областях, как биофармацевтика (открытие лекарств), разработка вакцин, исследования стволовых клеток, клеточная и генная терапия, токсикологические испытания, косметика, биозащита, диагностическое здравоохранение, мониторинг окружающей среды и фундаментальные научные исследования.

Криоконсервация гамет и эмбрионов является важным аспектом вспомогательных репродуктивных технологий. Углубленное понимание биохимических процессов при замораживании половых клеток может повысить успешность процедур ЭКО и сохранения фертильности.

Изучение реакций клеток на экстремально низкие температуры и процессов, происходящих при замораживании и оттаивании, может дать новые знания о механизмах клеточной адаптации, стрессоустойчивости и регуляции метаболизма. Эти знания могут быть применены в различных областях биологии и медицины, включая исследования старения и разработку новых терапевтических подходов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Шамитова Е.Н. – руководство сбором данных, редактирование и утверждение полного текста статьи;

Валеева Д.Т. – сбор данных, обработка материалов, написание текста, подготовка чернового и окончательного варианта статьи;

Никифорова У.А. – редактирование, дизайн окончательного варианта статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ващенко В.И., Чухловин А.Б., Петренко Г.И., Вильянинов В.Н., Багаутдинов Ш.М. Действие факторов замораживания на изменения внутриклеточного метаболизма при криоконсервации костного мозга человека. *Вестник международной академии холода*. 2015;(4):91-94.
2. Грищенко В.И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя здоровья нации. *Проблемы криобиологии*. 2008;18(3):269-274.
3. Ефремов М.И., Илларионова К.Г., Шамитова Е.Н., Дьячкова И.М. Перспективные биоантиоксиданты с низкой токсичностью. *Здравоохранение Чувашии*. 2023;4:46-55.
4. Землянских Н.Г., Кофанова О.А. Ca²⁺ - АТРаза эритроцитов человека модифицируется под действием глицерола и низких температур. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2005.
5. Одинцова И.А., Русакова С.Э., Шмидт А.А., Тимошкова Ю.Л. Криоконсервация половых клеток: история и современное состояние вопроса. *Гены и клетки*. 2021; 16(3):44-51.
6. Олейник Г.А., Баранова С.В., Жданова П.В., Чернонос А.А. Структурные особенности лед-связывающих белков. *III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов*. 2022;3:18.
7. BAUST J.G., GAO D., BAUST J.M. CRYOPRESERVATION: AN EMERGING PARADIGM CHANGE. *ORGANOGENESIS*. 2009;5(3) :90-96.
8. BAUST J.M. DEVELOPMENT OF NOVEL DEVICES FOR THE CONTROLLED. AND RAPID FREEZING AND THAWING OF VIABLE CELL PRODUCTS. *PRESENTED AT THE ISBioTECH 2ND FALL MEETING*. ROSSLYN, VIRGINIA, USA. 2014:2014.
9. BAUST J.M., CAMPBELL L.H., HARBELL J.W. BEST PRACTICES FOR CRYOPRESERVING, THAWING, RECOVERING, AND ASSESSING CELLS. *IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY -ANIMAL*. 2017;53:855-871.
10. BAUST J.M., CORWIN W.L., SNYDER K.K., BAUST J.G., VAN BUSKIR R.G. DEVELOPMENT

AND ASSESSMENT OF A NOVEL DEVICE FOR THE CONTROLLED, DRY THAWING OF CRYOPRESERVED CELL PRODUCTS. *BIOPROCESSING SPRING*. 2016;15(1):30-41.

11. FAHY G.M., WOWK B., WU J., PAYNTER S. IMPROVED VITRIFICATION SOLUTIONS BASED ON THE PREDICTABILITY OF VITRIFICATION SOLUTION TOXICITY. *CRYOBIOLOGY*. 2004;48(1):22-35.
12. KARLSSON J.O., TONER M. LONG-TERM STORAGE OF TISSUES BY CRYOPRESERVATION: CRITICAL ISSUES. *BIOMATERIALS*. 1996;17(3):243-256.
13. KARLSSON O.M. A THEORETICAL MODEL OF INTRACELLULAR DEVITRIFICATION. *CRYOBIOLOGY*. 2001;42(3):154-169.
14. MAZUR P., LEIBO S.P., CHU E.H. A TWO-FACTOR HYPOTHESIS OF FREEZING INJURY: EVIDENCE FROM CHINESE HAMSTER TISSUE-CULTURE CELLS. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*. 2015;71(2):345-355.
15. WOLKERS W.F., CROWE L.M., TSVETKOVA N.M., TABLIN F., CROWE J.H. IN SITU ASSESSMENT OF ERYTHROCYTE MEMBRANE PROPERTIES DURING COLD STORAGE. *MOLECULAR MEMBRANE BIOLOGY*. 2004;19(1):59-65.