



О живой и мертвой воде

Доктор биологических наук
С.Я.Амстиславский,
доктор биологических наук, профессор
М.П.Мошкин

ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

Идеи криоконсервации для непрофессионала часто ассоциируются с крионикой. Тема крионики затрагивается во многих известных книгах и кинофильмах, таких, например, как «Бегство мистера Мак-Кинли», «Vanilla sky», «Sleeper», «Sex mission» — всех не перечислить. Но именно «Бегство мистера Мак-Кинли», где Владимир Высоцкий пел свою знаменитую «Балладу об уходе в рай», еще в 70-е годы принесло в нашу страну идеи крионики, познакомив попутно с основными понятиями криобиологии. Прежде всего — с самой возможностью сохранения

жизни в условиях глубокой заморозки, то есть с криоконсервацией.

Сразу уточним, что термин «криоконсервация» в современной биологической литературе означает консервацию биологических объектов в течение некоторого времени при температуре жидкого азота — при -196°C . Успешной она считается, если объект полностью сохраняет свою жизнеспособность после размораживания.

Началом бурного подъема криобиологии следует считать 1949 год, когда английские биологи К.Полдж и О.Смит открыли, что трехатомный спирт глицерин обладает свойствами криопротектора. До самого последнего времени, однако, криоконсервация с успехом применялась лишь по отношению к суспензиям клеток, сперматозоидам, ранним стадиям развития эмбрионов или другим микроскопически мелким объектам. Попытки «заморозить» более крупные объекты, например органы, заканчивались неудачей. Лишь в конце XX — начале XXI века появились обнадеживающие результаты и в этой области и стало можно всерьез говорить о перспективах сохранения органов и тканей в условиях криобанка.

Понятие «криобанк» очень важно для нашей статьи. Когда говорят о криобанке, то зачастую имеют в виду лишь криобиологические сосуды, где в условиях глубокой заморозки подолгу хранится биологический материал. Например, на рис. 1 показан криобанк семени собак, который один из авторов посетил в Финляндии в 2004 году. Трудно поверить, что в этом небольшом хранилище содержится генофонд множества пород! Однако, как правильно отметил Дэвид Вилдт, один из лидеров в применении репродуктивных технологий для сохранения дикой жизни, криобанк — это не сосуды с жидким азотом, но прежде всего технология. Иными словами, любой биологический материал нужно сначала получить в достаточном количестве, затем заморозить, правильно сохранить и, наконец, при необходимости суметь «оживить» его.

Вот здесь мы и подходим к «живой и мертвой воде». Об этих сказочных жидкостях мы вспоминаем всякий раз, когда приходится замораживать и размораживать эмбрионы млекопитающих. При заморозке эмбрионы, запечатанные в специальные пластиковые соломинки, погружают в жидкий азот — чем не «мертвая вода»? Ведь если погрузить в него любой живой объект, не прошедший предварительной обработки, он погибнет. Однако специально подготовленным биологическим объектам встреча с глубоким холодом не страшна. «Мертвая вода» их не убивает, хотя все жизненно важные процессы замирают. В этом состоянии они теоретически могут храниться неопределенно долго, пока не будут разморожены. А роль «живой воды» играет обычная вода при температуре $37\text{—}38^{\circ}\text{C}$. В сосуд с такой водой помещают пластиковую соломинку с эмбрионами или семенем после окончания периода криохранения. «Оживленные» эмбрионы или сперматозоиды можно ввести в лоно «приемной матери», и начнется развитие *in vivo*, либо эмбрионы можно поместить в специальный прибор — инкубатор, в котором поддерживается определенный уровень влажности и оптимальное соотношение газов. В таком инкубаторе эмбрион будет развиваться *in vitro*.

Но перед тем как приступить к рассказу о конкретных направлениях применения криоконсервации, вернемся к тому, с чего мы начали, — к крионике. В своей знаменитой книге «Перспективы бессмертия», опубликованной в 1964 году, Роберт Эттингер впервые подробно изложил основные идеи крионики — и стал лидером в новой области. В этой книге, основным идеям которой следу-



1
Криобанк семени псов (Финляндия).
Фото из коллекции С.Я.Амстиславского

ют практики от крионики и в наши дни, Эттингер предложил метод «путешествия во времени». Изучив современную ему литературу по криобиологии, он сделал вывод, что криоконсервация при температурах жидкого азота или даже жидкого гелия позволит сохранить и человеческое тело для последующего оживления в будущем. Однако ни тогда, ни в наши дни наукой не зарегистрировано ни одного случая успешной криоконсервации при этих температурах какого-либо животного, размер которого превышал бы несколько миллиметров.

Проснутся ли крионавты?

Большинство известных криобиологов критически воспринимают идеи крионики, особенно современные попытки применения их на практике. Возможность «оживления» крионавтов никогда не была подтверждена экспериментально. С другой стороны, криобиология, в отличие от крионики, базируется на выверенных экспериментом фактах и строгом математическом аппарате. Однако для людей, которые не имеют специального медицинского или биологического образования, слова «криобиология» и «крионика» звучат очень похоже. По видимому, в этом одна из причин того, что крионика широко обсуждается и в наши дни. Кроме того, несмотря на спорность и невозможность экспериментальной проверки некоторых главных положений крионики, основополагающая книга по крионике «Перспективы бессмертия» Роберта Эттингера очень хорошо написана и представляет собой законченное и яркое литературное произведение.



2
В настоящее время в мире существует около 10 тысяч разных линий мышей. В ближайшие 20 лет их число может достичь 300 тысяч. Криобанк помогает сохранить это разнообразие



3
Криобанк Джексонской лаборатории, США (фото из коллекции Джексонской лаборатории, публикуется с разрешения доктора Карлисла Лэндела)

Практические же услуги по «достижению бессмертия» вплоть до самого последнего времени оказывались лишь в США, главным образом в фирме «Алькор» и в Институте крионики. В основанном Эттингером Институте крионики на сегодняшний день хранятся при температуре жидкого азота тела примерно 75 крионавтов, а также около 40 их питомцев — кошек и собак. У фирмы «Алькор», которая сегодня лидирует в области практической крионики, клиентов приблизительно столько же, однако большая их часть находится в состоянии «нейро» — сохранен в криоконсервированном виде лишь головной мозг. (В Институте крионики такую услугу не предлагают, там замораживают тело целиком.)

В пятом номере «Химии и жизни» за 2001 год известные криобиологи из харьковского Института криобиологии и криомедицины Г.А.Бабийчук и В.И.Грищенко напрямую поставили самый главный вопрос в связи с крионикой: «Проснутся ли «замороженные»?» Ответ профессиональных криобиологов был скептическим. Мы разделяем этот скептицизм. Оживление крионавтов, сохранение личности путем заморозки тела человека (или лишь его головного мозга) и в наши дни остается пока такой же иллюзорной целью, как и в 1960-е, когда Эттингер писал свою знаменитую книгу.

Однако едва ли стоит утверждать однозначно, что крионика — это плохо. Люди, которые верят в научно-технический прогресс и в то, что у крионики есть будущее,

инвестируют весьма крупные суммы в «криоконсервацию» своих тел, но крионика в этом смысле — не уникальное явление. Множество людей по всему земному шару вкладывают средства в рискованные предприятия. Можно вполне определенно утверждать, что у крионавтов, которые были заморожены до сих пор, шансы быть «оживленными» нулевые. Однако через несколько веков или тысячелетий они могут оказаться ценнейшим историческим материалом. Современных антропологов, например, крайне интересует, какими были наши предки, жившие в доисторические времена. Например, в 1991 году в Альпах был найден так называемый «ледяной человек», погибший около 5300 назад и прекрасно сохранившийся во льду (<http://www.students.emory.edu/HYBRIDVIGOR/cryonics.htm>). Находку изучали с применением всех доступных в наше время научных методов, результаты этих исследований опубликованы в престижных международных журналах. Если учесть, что морфологическая структура тела гораздо лучше сохраняется в жидком азоте, чем во льду, крионавты, хранящиеся в сосудах «Алькора» и Института крионики, могут оказать неоценимую услугу антропологической науке будущего.

Классическая криобиология и современные репродуктивные технологии

В 60-е, тогда же, когда Роберт Эттингер писал свою книгу, доминирующим методом замораживания было относительно медленное охлаждение биологических объектов (так называемое программное замораживание). В наше время сотни тысяч эмбрионов крупного скота, других сельскохозяйственных, а также лабораторных животных подвергают криоконсервации. В самых крупных генетических центрах, например в Джексонской лаборатории (США), где имеется самый большой в мире криобанк мышей, и в наше время пользуются именно медленным замораживанием, основанным на двухфакторной теории Петера Мэйзура.

Криобиолог Петер Мэйзур и его ученики математически и биологически описали процессы, которые происходят в ходе программного замораживания. Это теоретическое обоснование того, что уже использовали практики, получило названия «двухфакторной теории Мэйзура». Согласно этой теории, основные повреждающие факторы при медленном замораживании — образование внутриклеточных кристаллов льда и экспозиция клеток в гиперосмотических растворах (то есть в растворах с высокой концентрацией солей, которые образуются, когда вода в жидкой фазе вокруг эмбрионов начинает кристаллизоваться в лед). Отсюда следовали важные для практиков выводы: степень повреждения клеток зависит от проницаемости клеточной мембраны и скорости охлаждения.

С учетом этого были разработаны оптимальные программы замораживания, которые различались как для

разных типов замораживаемых объектов, так и для разных видов животных. Эти программы позволяли успешно замораживать клеточные суспензии, сперматозоиды и преимплантационные (то есть еще не имплантировавшиеся в матку) эмбрионы. При замораживании микроскопически мелких объектов образование внутриклеточных кристаллов льда минимально, так как внутриклеточная вода успевает выйти через клеточные мембраны, а экспозиция в гиперосмотических растворах получается недолгой. Кроме глицерина, применяют и другие криопротекторы, например диметилсульфокид и этиленгликоль. Показано, что разные криопротекторы по-разному проникают в клетки и мера их токсичности зависит не только от времени экспозиции и типа клеток, но и от температуры. Таким образом, оптимальные условия замораживания обычно подбирают экспериментально, при этом, конечно, учитывая основные положения теории Мэйзура.

Самые крупные стадии в развитии млекопитающих, которые когда-либо удавалось замораживать при помощи традиционных способов, описанных выше, — это преимплантационные эмбрионы. Их размер у большинства видов млекопитающих составляет несколько десятых долей миллиметра, однако это уже многоклеточный организм, и, чтобы достичь успеха, зачастую приходится прибегать к разным ухищрениям. Тем не менее эмбрионы лабораторных грызунов, большинства домашних животных, включая крупный рогатый скот и пушных зверей, а также диких млекопитающих замораживают и хранят при температуре жидкого азота. Напомним, что «успешной заморозкой» мы называем лишь те случаи, когда после криоконсервации эмбрионы были разморожены, трансплантированы самке-реципиенту и родилось живое потомство. Это единственный критерий, которому доверяет научное сообщество.

Когда программное замораживание, основанное на двухфакторной теории Мэйзура, попытались применить к более крупным объектам, результаты заморозки были в подавляющем большинстве случаев отрицательными. Органы состоят из разных типов клеток, причем между ними имеются сложные межклеточные контакты. Каждый тип клеток имеет свои собственные криобиологические характеристики, и программа охлаждения, рассчитанная для одних клеток, может оказаться совсем неподходящей для других. Чаще всего разрушаются межклеточные контакты. Самое же главное осложнение состоит в том, что величина органов измеряется не микронами и даже не миллиметрами, поэтому соотношение поверхности и объема у них очень далеко от оптимума.

Альтернативный подход к замораживанию биологических объектов получил название «витрификация». Теоретические основы витрификации с использованием достаточно сложного математического аппарата разработал еще в 1930-х годах Бэзил Льюэт с учениками и коллегами. Согласно теоретическим предсказаниям Льюэта, при очень высоких концентрациях криопротекторов в среде и очень быстром снижении температуры объект переходит в стекловидное состояние, минуя фазу кристаллизации. Некоторое время этот подход оставался на втором плане, заслоненный успехами программного замораживания. Кроме того, казалось, что выполнить рекомендации Льюэта технически сложнее, чем те, что предлагает теория Мэйзура.

Тем не менее когда криобиологи столкнулись с проблемами, возникающими при криоконсервации органов, они вспомнили про витрификацию. В наши дни этот метод считается перспективным не только для замораживания

мелких биологических объектов, таких, как эмбрионы, сперматозоиды и клеточные суспензии, но и для замораживания срезов органов и тканей и даже целых органов. Таким образом, например, недавно удалось заморозить почку кролика до температуры -45°C , причем после размораживания и трансплантации эта почка нормально функционировала. Это еще не криоконсервация в точном смысле слова, так как почку не охлаждали до температуры жидкого азота, но все же прогресс налицо.

Особенно успешными оказались опыты по замораживанию генеративных органов — семенников и яичников. Этот подход даже рекомендован как одна из реальных возможностей восстановления плодовитости у людей, перенесших химио- и лучевую терапию при лечении рака в раннем возрасте. Не так давно родился первый ребенок пациентки, у которой до начала химиотерапии были удалены и подвергнуты криоконсервации яичники. После окончания курса лечения и полного выздоровления этой молодой женщине трансплантировали ее собственную яичниковую ткань, взятую из криобанка, где она сохранялась при температуре жидкого азота несколько лет. Через некоторое время эта женщина смогла родить собственного ребенка, зачатого естественным путем.

Не менее впечатляют и данные, полученные на животных. В работе японских авторов, опубликованной в 2006 году, сообщаются результаты удивительного эксперимента. Репродуктивные органы самцов мышей хранились в холодильнике при температуре -20°C в течение 15 лет. Затем эти органы вынули из холодильника и получили из них сперматозоиды. Они были неподвижны, причем специальные тесты подтвердили, что они «мертвы», хотя признаков дегенерации ДНК не было. После инъекции этих сперматозоидов в подготовленные ооциты (половые клетки самок) некоторые из них стали развиваться. Трансплантация полученных эмбрионов привела к рождению потомства.

Эта работа показывает, что не столь уж фантастичны проекты восстановления исчезнувших видов животных. Если в семенниках мамонта или саблезубого тигра, найденных в вечной мерзлоте, сохранились мертвые сперматозоиды с неповрежденной ДНК, то получить потомство от этого животного хоть и очень сложно, но реально. Сперматозоиды можно инъецировать в ооциты ныне живущих родственников этих вымерших видов и затем трансплантировать эмбрионы самкам-реципиентам. (О межвидовой трансплантации мы писали год назад в сентябрьском номере «Химии и жизни» за 2006 год.)

Еще один перспективный подход — криоконсервация срезов органов. В 2006 году была опубликована статья Юрия Пичугина (этот украинский ученый в настоящее время работает в Америке) в соавторстве с двумя другими известными американскими криобиологами. В этой работе было продемонстрировано, что клетки одного из отделов головного мозга крыс — гиппокампа — сохранили жизнеспособность после витрификации и хранения при температуре жидкого азота. Причем криоконсервировали не отдельные клетки, а срезы мозга. Эта действительно интересная работа была интерпретирована сторонниками крионики из уже упоминавшейся фирмы «Алькор» как аргумент в пользу возможности криоконсервации человеческого мозга. Однако толщина срезов гиппокампа в работе Пичугина с соавторами составляла всего 500 микрон. Не надо быть специалистом, чтобы понять, что заморозить такой срез несравненно легче, чем целый мозг. Кроме того, критерии оценки жизнеспособности, применяющиеся в экспериментах по криоконсервации органов и тканей, весьма субъективны и

односторонни. По мнению Дэвида Пега из Великобритании, мирового лидера в деле консервации органов, большинство существующих критериев не дает однозначного ответа на вопрос, «жив» или «мертв» объект. В работе с гиппокампом таким критерием считалась способность клеток, перенесших криоконсервацию, поддерживать высокие концентрации внутриклеточного калия. Но кто может сказать, будут ли нейронные процессы в этих срезах протекать точно так же, как и до заморозки? Так или иначе, эта работа показывает, что потенциал методов криобиологии далеко не исчерпан.

Учимся у природы

И все же... Так ли безосновательны надежды апологетов крионики на то, что в будущем способ глубокой заморозки человеческого тела будет найден?

В природе можно найти множество примеров, когда личинки насекомых, моллюски, амфибии и рептилии переживают холодный период в замороженном состоянии и «оживают», согретые весенним солнцем или омытые «живой водой». Это, конечно, не криоконсервация, так как зимние температуры на планете Земля никогда и нигде не достигали -196°C . И все же способность некоторых животных сохранять в себе жизнь при низких температурах просто поражает воображение. Например, лесная лягушка (*Rana sylvatica*) переживает зиму в виде хрупкого ледяного куска. Около 35% жидкостей ее тела при этом превращаются в лед. Такие «зимние» лягушки не только не питаются, но и не дышат, а что самое поразительное — у них даже не бьется сердце. Если бы криобиологам удалось до конца разобраться в этом чуде природы, то открылась бы новая эпоха криобиологии и криомедицины и мечты Роберта Эттингера и его последователей, вполне возможно, превратились бы из фантастики в реальность.

Однако кое-что уже ясно. Оказывается, животные, способные к переживанию зимней стужи в замороженном состоянии, научились использовать законы криобиологии, о которых мы упомянули в предыдущем разделе! Разумеется, лягушка в своей болотной жизни не читала Полджа и Смита. Тем не менее она вырабатывает и накапливает в тканях своего тела глицерин. Этот криопротектор позволяет лягушке до того, как ее маленькое, но бесстрашное сердце перестанет биться, так отрегулировать льдообразование в своем теле, что лед скапливается главным образом под кожей конечностей и в кишечнике, а внутри тканей если и образуется, то в виде очень мелких кристалликов, не столь опасных для жизни.

Маленькая лягушка может многому научить не только криобиологов, но и медиков. Чтобы подготовить ткани своего тела к зимовке, лягушки научились решать множество физиологических проблем. Например, они используют в качестве криопротектора не только глицерин, но и глюкозу! Напомним, что повышение концентрации глюкозы в крови человека приводит к множеству губительных последствий, лягушке же оно нисколько не вредит. Возможно, когда-нибудь она подарит человечеству и лекарство от диабета.

И это еще не все сюрпризы, какие лягушка приготовила ученым. Самая большая проблема при криоконсервации органов и тканей возникает из-за множественных кровотечений в процессе размораживания — рвутся сосуды. Лягушка же умеет во много раз усиливать свертывающую способность своей крови. Поэтому повреждения в ее сосудах быстро ликвидируются. А недавно было обнаружено, что заморозка повышает в тканях этих ма-



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

леньких амфибий содержание некоторых белков. Такие белки вырабатываются в мозге крыс в условиях гипоксии. Очевидно, что именно они, а также антиоксиданты, найденные в избытке у готовящейся к «замерзанию» лягушки, помогают ей пережить кислородное голодание, когда превращенная в хрупкий кусок льда зимняя лягушка перестает дышать.

По-видимому, в будущем ученым удастся установить, за счет активации (или инактивации) каких генов лягушке удастся пережить «обмерзание». К счастью, в арсенале генетиков сейчас появились совершенно новые инструменты. У так называемых «нокаутных» мышей избирательно отключают какой-либо ген, а трансгенные мыши, наоборот, получают ген, которого у них не было. Таким образом, на мыши возможно будет промоделировать удивительные процессы, происходящие в организме лягушки. А мышь — это уже млекопитающее, как и человек.

Но бурный прогресс генетики имеет и обратную сторону. Алисон Абботт из США в статье, опубликованной в журнале «Nature», предсказывает, что в ближайшие 20 лет число линий мышей, необходимых для работы генетиков, физиологов, медиков и других специалистов, достигнет 300 тысяч. Такое количество разных линий просто невыносимо сохранить, разводя мышей традиционным способом. Уже сейчас, когда их общее число достигло 10 тысяч, невозможно обойтись без своего рода архивов — криобанков эмбрионов (рис. 2). Об этом речь в следующей главе.

Как криобанки помогают генетикам?

Заглянем на сайт Джексоновской лаборатории (США), в которой поддерживается самая крупная в мире коллекция мышинных генотипов (<http://www.jax.org>). Как сообщается на этом сайте, лаборатория продает около двух миллионов мышей в год. Общее же число линий, поддерживаемых в этой лаборатории, составляет более 3000. Характерно, что около 2500 этих линий поддерживаются исключительно в виде криобанка эмбрионов (рис. 3). Причем ежегодно там восстанавливают из криобанка (под заказ) около 400 линий мышей. Лишь 800 наиболее востребованных линий поддерживаются в виде живой коллекции, однако и они дублируются в криобанке.

Интересна история создания этого уникального и пока самого крупного в мире «замороженного архива». В 1947 году в Джексоновской лаборатории возник пожар, после которого и решили создать «архив». И когда в 1989 году в лаборатории случился еще более разрушительный пожар — он бушевал пять часов, около полумиллиона мышей сгорело заживо, — криобанк действительно очень помог. Некоторые из линий существуют только в коллекции Джексоновской лаборатории и более нигде в мире, так что восстановить их можно было лишь из ее собственного криобанка. Кроме того, «криоархив» способ-

ствует поддержанию чистоты линий. Если мыши размножаются традиционным способом, в линии накапливаются случайные мутации, вдобавок, как и все живые существа, мыши подвержены заболеваниям. Криобанк эмбрионов необходим не только для восстановления линии, погибшей от инфекции, но и для очистки линии от этой инфекции.

Другие крупные генетические центры также предпочитают хранить свои коллекции в виде замороженных эмбрионов и семени. Например, при Центре исследования млекопитающих (MRC) в Великобритании создан крупный криобанк — FESA (Frozen Mouse and Sperm Archive) (<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk>). В нем хранится около 400 тысяч эмбрионов, или 1200 линий мышей — в среднем более 300 замороженных эмбрионов на линию. Большинство экспертов сходятся на том, что для надежной консервации нужно 200—500 эмбрионов. Однако, как свидетельствует мировой опыт, иногда удается восстановить линию всего лишь из 20 эмбрионов.

Как уже говорилось, в наше время создаются криобанки не только эмбрионов, но также сперматозоидов, яйцеклеток и даже яичниковой ткани. Тем не менее архивы коллекций мышей делают ставку прежде всего на эмбрионы. Понятно, что эмбрион — диплоидный организм, в то время как сперматозоиды и яйцеклетки гаплоидны, и поэтому для полноценного архивирования линии можно консервировать либо эмбрионы, либо гаметы обоего пола (то есть и сперматозоиды, и яйцеклетки). Первый путь экономически более оправдан, тем более что второй путь требует еще одного технологического этапа — размороженные сперматозоиды и яйцеклетки должны соединиться, чтобы образовать эмбрион. И хотя при архивировании мышиных коллекций наряду с эмбрионами во многих случаях криоконсервируют еще и сперматозоиды, предпочтение отдается именно эмбрионам. Что же касается яйцеклеток, то при их замораживании и криоконсервации возникает максимальное число проблем.

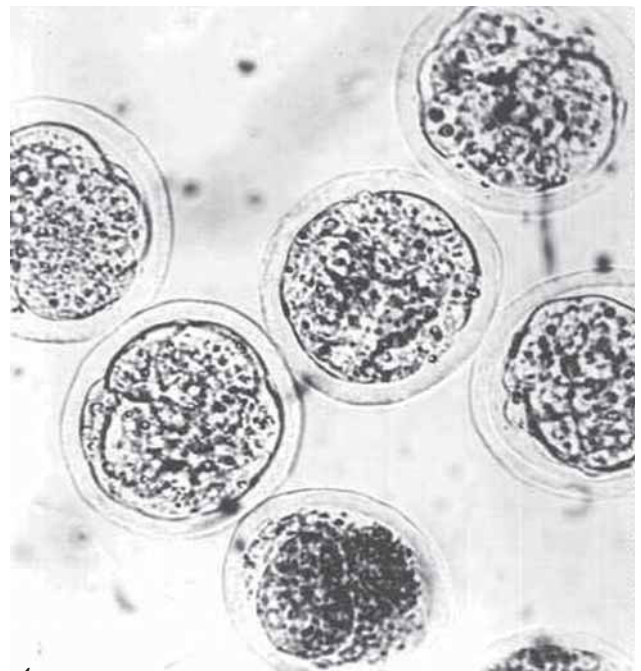
От чего же зависит эффективность процедур, связанных с рискованным купанием эмбрионов в «мертвой и живой воде»? Оказывается, способность сохранить жизнь при подобных «купаниях» определяется не только тем, насколько отработана технология, но и генетическими характеристиками эмбрионов. По нашим собственным данным, выживаемость зародышей мышей семи различных генотипов после криоконсервации составила от 20 до 71%. Эмбрион — это уже особь, и у него есть четкая программа развития, закодированная в геноме. Даже на самых ранних стадиях можно говорить об особенностях строения и физиологии эмбриона — и о различиях в «прочности» и стабильности жизненных функций — как между отдельными эмбрионами, так и между представителями разных линий.

Проблемы возможны не только на этапе замораживания-оттаивания, но и при получении эмбрионов, а особенно при «оживлении» и трансплантации в матку приемной матери, чаще называемой «реципиентом». Хотя обычно предсказать судьбу размороженных эмбрионов можно, просто посмотрев на них в микроскоп. На рис. 4 показаны зародыши мышей, размороженные после криоконсервации. Видно, что клетки одного из эмбрионов потемнели. Этому зародышу не повезло: шансы на то, что он будет нормально развиваться, близки к нулю. Такой простой критерий оценки жизнеспособности эмбрионов после процедур криоконсервации чаще всего не подводит, хотя в некоторых случаях оказывается недостаточным.

Следующий принципиально важный вопрос: как долго можно сохранять замороженные эмбрионы в жидком азоте? В нашей практике был случай, когда эмбрионы крыс были разморожены через два года, трансплантированы реципиенту и развились во вполне нормальных крысят. Сейчас в мире накоплен обширный опыт, который позволяет уверенно утверждать: если эмбрионы были грамотно заморожены и подача азота была бесперебойной, то не важно, хранились ли они в жидком азоте несколько секунд или десятки лет. Так, например, группа Д.Уиттингема в Великобритании в 1972 году разработала способ заморозки эмбрионов мышей, и они были заморожены впрок. С тех пор прошло более 30 лет, но эмбрионы, хранящиеся в криобанке, нисколько не потеряли своей способности «оживать».

Еще один важный аргумент в пользу криобанков — упрощается пересылка и обмен генетическим материалом. Живые мыши в дороге могут заразиться и даже погибнуть от перепадов температуры. К тому же всякий, кто перевозил животных, особенно через границу, знает, как сложно бывает оформить на них документы. При пересылке замороженного материала бюрократические процедуры гораздо проще. Таким способом иногда удается найти выход из совершенно тупиковых ситуаций. Законы, касающиеся ввоза или вывоза живых животных, особенно строги в Австралии: оленеводы, решившие «прилить свежую кровь» от оленей из Новой Зеландии, узнали, что привезти живых оленей даже из этой соседней страны не позволяет закон, а вот замороженных, в виде криоконсервированных эмбрионов — можно. Специальные транспортные сосуды «dry shippers» сделали пересылку генетического материала удобной и безопасной. Жидкий азот в них удерживается на специальном адсорбенте, так что их можно не дозаправлять неделю и более. Кроме того, в таких сосудах нет жидкой фазы азота, поэтому упрощаются или отпадают как технические, так и юридические проблемы, связанные с перевозом замороженного генетического материала в самолетах.

Следует также помнить, что процедура трансплантации (при грамотном ее исполнении) позволяет очистить ли-



4

Зародыши мышей после замораживания, криоконсервации при -196°C и оттаивания при $+38^{\circ}\text{C}$

нию от вирусов, в том числе и от тех, которые мать передает детенышам. Дело в том, что эмбрион во время своего путешествия по яйцеводам и матке заключен в так называемую прозрачную оболочку (рис. 4), непроницаемую для вирусов. Правда, вирусы могут прилипнуть к оболочке, поэтому эмбрионы перед трансплантацией отмыывают в специальных стерильных средах. Таким путем можно извлечь линию от вируса мышинного гепатита, вируса Сендая, мышинного аденовируса и многих других.

Для хранения криоархива нужно лишь небольшое помещение, а единственный компонент, необходимый для поддержания жизни в криобанке, — жидкий азот. Вот о нем следует серьезно позаботиться. В хранилище должны быть предусмотрены системы автоматического пополнения азотом, индикаторы, которые подают сигнал в случае падения уровня жидкости, и многое другое. Полезно распределять материал по двум или более хранилищам, на случай, если в одном из них возникнет аварийная ситуация. Конечно, перевод линии в криобанк и ее оживление требуют работы квалифицированных биотехнологов, покупки дорогостоящих программных замораживателей и т. д. Тем не менее Карлисл Лэндел, один из главных создателей криобанка Джексоновской лаборатории, считает, что затраты по переводу той или иной линии в криобанк во всех случаях оказываются существенно меньшими, чем поддержание этой линии в питомниках в живом виде.

В 2005 году была создана международная сеть мышинных ресурсов, состоящая из 17 генетических центров, имеющих криобанки. Эти центры расположены на четырех континентах (Америка, Европа, Азия и Австралия), причем Америка представлена шестью центрами в США и двумя в Канаде, Европа — шестью национальными центрами в Великобритании, Германии, Франции, Швеции, Италии и Португалии, объединенными под эгидой ЕММА (European mouse mutant archive), Азия — двумя японскими центрами, Австралия же всего одним.

Вероятно, главной причиной, которая побудила ведущие генетические центры перевести живые коллекции мышей в форму криоархива, было не только стремительное увеличение числа линий, но и ужесточение международных требований к содержанию лабораторных животных. Разведение мышей в соответствии с этими требованиями означает огромные затраты на качественные корма, поддержание высоких стандартов воздуха и воды, ветеринарный контроль и т. д. Единственный в России питомник лабораторных животных, сертифицированный в соответствии с международными стандартами, расположен в городе Пущине недалеко от Москвы. Там поддерживается всего лишь дюжина известных линий мышей, несколько линий крыс и одна линия сирийских хомячков. Другой центр разведения лабораторных животных, где будут поддерживаться столь же высокие стандарты качества, строят по соседству с нашим институтом в Новосибирске. Однако в соответствии с требованиями времени мы планируем сразу же создать и криобанк, который будет одновременно и архивом, и своеобразными «воротами» в этот центр.

Прирастать будет Сибирию...

Известная фраза М.В.Ломоносова «Российское могущество прирастать будет Сибирию» особенно актуальна в наше время. Ведь Сибирь XXI века — это не только леса, воды и ископаемые, но и мощный научный потенциал, сосредоточенный в центрах, подобных новосибирскому Академгородку, который по праву считается жемчужиной Сибири.



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

Именно там находится знаменитый Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, недавно отметивший свое 50-летие. В прошлом прибежище опальных генетиков, институт сумел сохранить свой научный потенциал, пройдя через все перипетии советского периода и перестройки, и по-прежнему задает высокие стандарты в науке. В разное время институт возглавляли такие выдающиеся генетики, как Н.П.Дубинин, Д.К.Бе-



5

Здание строящегося в Академгородке Новосибирска современного центра беспатогенных мышей и криобанка

ляев и В.К.Шумный. Сегодня в нашем институте создается современный генетический центр (отдел генофондов), где планируется поддерживать коллекцию лабораторных животных, главным образом мышей и крыс (рис. 5). Особая заслуга в создании этого центра принадлежит академику В.К.Шумному, который возглавлял институт до 2007 года.

Создание такого современного вивария дает возможность российским ученым не оставаться в стороне от общемировых тенденций развития функциональной геномики. Немаловажно, что и в нашем институте, и в других биологических и медицинских учреждениях Сибири есть спрос на изучение животных с заданными генетическими свойствами, поскольку в них работают высокопрофессиональные биохимики, молекулярные биологи, физиологи, иммунологи, фармакологи.

В нашем центре, как и в Джексоновской лаборатории в США и европейских центрах, криобанк, прежде всего преимплантационных эмбрионов, должен занять одно из ключевых мест. И в самом деле: где, как не в Сибири, стране морозов и студеных зим, создавать криобанк? Предполагается, что центр приступит к работе в 2009 году, однако уже в 2008 году начнется формирование штата сотрудников центра и закупка оборудования. Быть может, молодые энергичные биологи и медики, узнав из этой статьи о достижениях, проблемах и перспективах криобиологии, вольются в наш коллектив и помогут в осуществлении этого сложного, но многообещающего проекта.

