

На правах рукописи

БОРОДА
АНДРЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТОВ НА
ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК
ЛИЧИНОК МОЛЛЮСКОВ И ИГЛОКОЖИХ ПОСЛЕ
КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор
Одинцова Нэлия Адольфовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Светашев Василий Иванович

доктор биологических наук,
Жадан Петр Михайлович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биофизики клетки РАН

Защита состоится «23» декабря 2010 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: 7 (4232) 31–09–05, факс: 7 (4232) 31–09–00.

E-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « » ноября 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Криоконсервация клеток личинок и целых эмбрионов – один из перспективных путей сохранения генофонда промысловых, а также редких и исчезающих видов животных и растений (Withers, 1987; Seymour, 1994). Учитывая, что водные экосистемы более уязвимы к антропогенной нагрузке, чем наземные, по инициативе профессора Б.Н. Вепринцева для исследования криоконсервации половых и эмбриональных клеток гидробионтов был разработан всероссийский проект "Низкотемпературный генетический банк промысловых и редких видов рыб и беспозвоночных". Актуальность развития методов криоконсервации клеток морских гидробионтов определяется не только необходимостью сохранения генофонда морских организмов в условиях усиливающегося антропогенного воздействия на Мировой океан, но и связана с потенциальной возможностью работы с эмбрионами и клетками этих объектов в течение всего года.

Различия в структуре и функции клеток являются причиной их неодинаковой реакции на низкую температуру, поэтому метод замораживания–оттаивания, разработанный для криоконсервации клеток одного вида, зачастую нельзя использовать для клеток других видов организмов. При замораживании клеток моллюсков и иглокожих в присутствии только традиционных криопротекторов, таких как диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин, используемых для криоконсервации клеток млекопитающих, происходит массовая гибель клеток, которая сопровождается значительным выходом свободных жирных кислот из липидов клеток. Ранее было установлено, что липидные экстракты из тканей морских гидробионтов с низкими температурами фазовых переходов обладают эффективными криозащитными свойствами и могут влиять на целостность клеточных мембран морских беспозвоночных (Odintsova et al., 2001; Odintsova et al., 2006). Особый состав жирных кислот клеточных мембран морских гидробионтов, в которых преобладают ненасыщенные жирные кислоты, влияет на криоустойчивость клеток этих объектов и требует принципиально новых подходов.

Цель и задачи работы

Цель работы – разработка новых типов криопротекторов для клеток моллюсков и иглокожих. Работа направлена на исследование механизмов криоустойчивости клеток этих объектов и ориентирована на сохранение биоразнообразия морских организмов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать оптимальные режимы для замораживания–оттаивания клеток моллюсков и иглокожих и изучить кинетику формирования, роста и перекристаллизации частиц льда при замораживании криозащитных смесей различного состава.

2. Исследовать выживаемость клеток личинок моллюсков и иглокожих после глубокого замораживания в присутствии традиционных криопротекторов.

3. Изучить влияние антиоксидантов и экзогенных липидов из тканей морских гидробионтов на выживаемость клеток личинок моллюсков и иглокожих после цикла замораживания–оттаивания.

4. Провести сравнительное морфофункциональное исследование клеток личинок моллюсков и иглокожих после цикла замораживания–оттаивания в присутствии традиционных криопротекторов и разработанных нами криозащитных смесей.

5. Изучить состав жирных кислот липидов клеток личинок моллюсков и иглокожих до и после замораживания в криозащитных смесях различного состава.

Научная новизна и теоретическое значение работы

Предложен новый подход для сохранения клеток морских беспозвоночных, включающий совместное использование мембранных стабилизаторов, экзогенных липидов и антиоксидантов. Комбинация этих компонентов обладает синергизмом действия, способствуя восстановлению физиологической активности клеток моллюсков и иглокожих после глубокого замораживания. Впервые установлено, что антиоксиданты, как отдельные компоненты криозащитной смеси, не обладают защитным действием. Обнаружены значительные различия в составе жирных кислот липидов клеток личинок до и после замораживания. Введение дополнительных криопротекторов (экзогенных липидов и антиоксидантов) в смеси, содержащие ДМСО и трегалозу, приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток после оттаивания и, как следствие, снижению доли насыщенных жирных кислот, повышению доли моноеновых и полиеновых жирных кислот.

Научно-практическое значение работы

Развитие данного направления исследований позволит снять географические, сезонные и временные ограничения при проведении экспериментальных работ на половых клетках и эмбрионах морских животных. Понимание механизмов криоповреждений будет способствовать созданию новых эффективных криопротекторов, использование которых даст возможность значительно увеличить количество жизнеспособных клеток морских беспозвоночных после оттаивания, и тем самым способствовать развитию биотехнологий, основанных на использовании культур клеток морских организмов. Запатентован новый способ криосохранения клеток морских беспозвоночных (Патент Российской Федерации № 2314687).

Личный вклад автора

Личное участие автора заключается в планировании, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором в полном объеме выполнена экспериментальная часть исследования: получение первичных культур клеток морских гидробионтов,

приготовление криозащитных смесей, замораживание и оттаивание клеток, определение функциональной активности клеток с использованием биохимических методов, наблюдение за процессами формирования частиц льда в криозащитных смесях. Кроме того, сформирована электронная база публикаций по криобиологии.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были представлены на международной конференции «Инновации в науке и образовании» (Калининград, 2005), 1-ом Дальневосточном международном симпозиуме по естественным наукам («1st Far-Eastern International Symposium on Life Sciences», Владивосток, 2008), школе-конференции для молодых ученых «Методы культивирования клеток» (Санкт-Петербург, 2008), международной конференции «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пушино, 2008), международной конференции Общества Криобиологии (CRYO 2009, «46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology», Саппоро, Япония).

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК и 1 патент Российской Федерации.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (07-04-00367), ДВО РАН (09-I-P22-04; 09-II-CO-06-001; 09-III-A-06-206 и НТ-08-016-04) и Фонда Содействия Развития малых форм предприятий в научно-технической сфере (2009–2010 гг.).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 109 страницах, иллюстрирована 14 рисунками и 7 таблицами. Список литературы содержит 168 наименований, из них 153 на английском языке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

Двустворчатые моллюски (*Mytilus trossulus*) и морские ежи (*Strongylocentrotus intermedius*) были собраны в заливе Восток Японского моря. Личинки получали путем искусственного оплодотворения. Личинки моллюсков на стадии трохофоры (24–26 ч после оплодотворения) и морских ежей на стадии плавающей бластулы (14–15 ч после оплодотворения) собирали на нейлоновые фильтры (размер ячеей 30 мкм).

Личинки морских беспозвоночных на ранних стадиях развития отличаются повышенной чувствительностью к различным неблагоприятным факторам окружающей среды, поэтому первичные культуры их клеток были выбраны в качестве модельных систем.

Получение первичных клеточных культур

Первичные клеточные культуры получали диссоциацией личинок коллагеназой (препарат получен из печени краба *Paralithodes camtschatica*, ТИБОХ ДВО РАН). Концентрация суспензии клеток перед добавлением криопротекторов составляла $5\text{--}10 \times 10^6$ клеток/мл для моллюсков и $13\text{--}26 \times 10^6$ клеток/мл для морских ежей.

Экстракция липидов

Материалом для получения общих липидных экстрактов послужили ткани зеленых водорослей *Ulva fenestrata*, гонады морских ежей *S. intermedius* и мягкие ткани двустворчатых моллюсков *Crenomytilus grayanus*. Все гидробионты были собраны в Амурском заливе (Японское море) в октябре–ноябре 2004–2009 гг.

Суспензию клеток (0.33 мл) личинок (*M. trossulus* и *S. intermedius*) осаждали центрифугированием 10 мин при 500 g. К осадку клеток до замораживания добавляли 1 мл стерильной морской воды, а для изучения вклада экзогенных липидов в состав жирных кислот липидов клеток до замораживания к осадку клеток добавляли 0.33 мл морской воды и 0.66 мл криозащитной смеси, содержащей ДМСО, трегалозу, общий липидный экстракт мидии *S. grayanus*, витамины С и Е. После замораживания–оттаивания к осадку клеток добавляли 1 мл стерильной морской воды. Эти суспензии клеток использовали для дальнейшей экстракции липидов.

Экстракцию общих липидов проводили по методу Фолча (Folch et al., 1957). В качестве антиоксиданта к препаратам липидов добавляли ионол (конечная концентрация в липидном экстракте 0.01%).

Разделение общего липидного экстракта *S. grayanus* проводили на колонке с силикагелем. Элюирование неполярных липидов проводили с помощью хлороформа и системы хлороформ–ацетон (1:1, по объему). Фракцию полярных липидов получали последовательным элюированием системами: хлороформ–метанол–вода (50:50:5, по объему); метанол; метанол–хлороформ–вода (70:30:10, по объему). Полученные фракции упаривали и растворяли в хлороформе.

Анализ состава жирных кислот липидов

Метилловые эфиры жирных кислот фосфолипидов получали метанолизом липидных экстрактов с безводной 5% HCl в метаноле при 95°C в течение 1 ч (Christie, 1993). Анализ метиловых эфиров ЖК проводили на газо-жидкостном хроматографе GC-9A (Shimadzu, Япония), оснащенным ионизационным детектором и колонкой 25 м × 0.25 мм с фазой Carbowax 20M. Идентификацию пиков МЭЖК на хроматограммах осуществляли на основании индексов эквивалентной длины цепи (Stransky et al., 1997) и при сравнении с известными стандартами.

Криопротекторы

Растворы всех криопротекторов были приготовлены на стерильной морской воде. В качестве основных криопротекторов использовали ДМСО, этиленгликоль, глицерин (в концентрации 10%) и трегалозу (20%). Аликвоты экзогенных липидов (общего липидного экстракта мидии *S. grayanus* (МЛЭ), фракции полярных (МЛЭп) и неполярных (МЛЭнп) липидов, общего липидного экстракта ульвы *U. fenestrata* (УЛЭ), холестерина или лецитина) вносили в криозащитные смеси (конечная концентрация 0.085–0.15%), нагретые до 68–70°C, и обрабатывали ультразвуком (30 КГц, 1–2 мин) с помощью ультразвукового диспергатора (Labsonic, Германия).

После внесения липидных экстрактов в криозащитные смеси добавляли в разных сочетаниях антиоксиданты (указана концентрация в криозащитной смеси): α-токоферол (витамин Е) (MP Biomedicals, Франция) – 0.01%, аскорбиновую кислоту (витамин С) (Sigma, США) – 0.005%, синтетический эхинохром (ТИБОХ ДВО РАН) – 0.01%, каталазу (Sigma) – 0.005–0.01%, супероксиддисмутазу (Sigma) – 0.005–0.01%, и восстановленный глутатион (Sigma) – 0.001%.

Замораживание суспензии клеток

Аликвоты суспензии клеток переносили в стерильные криопробирки (TPP, Швейцария), последние помещали на ледяную баню и затем постепенно добавляли раствор криопротектора. Подготовленные образцы в ледяной бане переносили в холодильную камеру и инкубировали 10 мин при 4°C. Дальнейшее замораживание проводили, используя один из следующих режимов. Режим замораживания №1 – охлаждение с 4 до –80°C в парах жидкого азота в пенопластовой камере в течение 20 мин (скорость охлаждения –4°C/мин) с последующим замораживанием в жидком азоте. Режим замораживания №2 – охлаждение с 4 до –33°C в криостате (LAUDA, Германия) с постоянным перемешиванием в течение 15 мин (скорость охлаждения – 2.5°C/мин), затем замораживание в морозильной камере до –80°C. Режим замораживания №3 – охлаждение с 4 до –33°C в криостате в течение 15 мин (скорость охлаждения –2.5°C/мин) с последующим помещением образцов в жидкий азот.

Оттаивание суспензии клеток

Через сутки хранения в жидком азоте, криопробирки помещали для оттаивания в водяную баню (18–20°C) при постоянном перемешивании. Сразу после оттаивания, к содержимому криопробирок постепенно добавляли 10 объемов стерильной морской воды (4°C). Образцы центрифугировали в течение 5 мин при 310 g, промывали морской водой и ресуспендировали в 0.33 мл модифицированной среды Лейбовича. Часть клеток после оттаивания культивировали при 17°C в течение 24–120 ч в 24-луночных планшетах (Corning, США), концентрация при посеве составляла $2\text{--}3 \times 10^6$ клеток/мл. Другую часть клеток использовали для приготовления липидного экстракта и дальнейшего изучения состава его жирных кислот.

Определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток оценивали до замораживания (интактные клетки), сразу после оттаивания (в пределах 40 мин) и через 24, 48, 72, 96 и 120 ч культивирования с помощью теста по исключению красителя трипанового синего, проводя прямой подсчет клеток в камере Горяева, и методом двойной окраски флуоресцентными красителями: флуоресцеин диацетат – пропидий йодид (Jones, Senft, 1985). Количество живых и мертвых клеток подсчитывали, по крайней мере, в пяти различных полях зрения по 500 клеток в трех параллелях. Количество разрушившихся клеток определяли по разнице между концентрацией клеток до замораживания и общей концентрацией живых и мертвых клеток после замораживания–оттаивания. Часть клеток культивировали в 24-луночных планшетах, наблюдая за морфологическими изменениями оттаянных клеток в течение нескольких суток. Наблюдения за клетками проводили с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Кроме оценки жизнеспособности клеток с помощью красителей, использовали МТТ-тест (восстановление 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом ферментами митохондрий), который проводили по стандартной методике (Mosmann, 1983). В течение часа после оттаивания к клеткам был добавлен МТТ, после чего клетки инкубировали в темноте при 18°C от 2 до 18 ч. Для растворения кристаллов формазана в каждую лунку добавляли 150 мкл 0.04N HCl в изопропанол, оптическую плотность полученного раствора измеряли при длинах волн 595 нм/620 нм с помощью планшетного спектрофотометра DTX-880 (Beckman-Coulter, США). В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду L-15M без клеток. Оптическая плотность раствора, полученного после МТТ-теста клеток до замораживания, была принята за 100% и соответствовала максимальному уровню жизнеспособности клеток (положительный контроль).

Оценка пролиферативной активности клеток

Включение аналогов нуклеотидов в состав ядерной ДНК является показателем пролиферативной активности клеток (Zaldibar et al., 2004). Пролиферативную активность клеток в течение часа после оттаивания оценивали с помощью включения аналога тимидина – 5-бромо-2'-

дезоксинуридина (БДУ). Клетки инкубировали в присутствии 1 мМ БДУ в течение 24 ч при 18°C и фиксировали 4%-ым параформальдегидом. Детекцию БДУ-иммуноположительных клеток проводили с использованием метода непрямой иммунофлуоресценции. Препараты анализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе TCS SP5 (Leica, Германия).

Криомикроскопия

Образцы криозащитных смесей, помещенных в камеру Фукса-Розенталя, охлаждали парами азота, затем жидким азотом, со скоростью от –20 до –25°C/мин. Наблюдения проводили в отраженном свете с использованием микроскопа Orthoplan (Leitz, Германия), оснащенный видеокамерой ВК-32 (Россия). Температуру образцов измеряли с помощью электронного термометра UT-320 (Uni-Trend, Гонконг) со специально изготовленной термопарой. Измерение геометрических параметров образующихся частиц льда проводили с помощью программы Reconstruct v.1.1.0 (Copyright © 2007 John C. Fiala) по полученным фотографиям.

Статистический анализ

Процентное содержание ЖК (ЖК, содержание которых составляло менее 0.5%, не учитывали), количество насыщенных, моноеновых и полиеновых ЖК анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA по тесту Ньюмана-Кеулса. Количество живых и мертвых клеток, геометрические параметры частиц льда анализировали с помощью Т-теста. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах. Результаты были обработаны при помощи программы Statistica v.6 (StatSoft Inc., 2001, www.statsoft.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность клеток личинок моллюсков и иглокожих

Жизнеспособность интактных клеток моллюсков и иглокожих составляла не менее 95%. После цикла замораживания–оттаивания жизнеспособность клеток, замороженных без криопротекторов, не превышала 2–2.5%. Из тестированных режимов замораживания наиболее эффективными для клеток мидии оказалось охлаждение с 4 до –33°C со скоростью –2.5°C/мин с последующим помещением образцов в жидкий азот (режим №3), а для клеток морских ежей – охлаждение с 4 до –80°C со скоростью –4°C/мин с последующим замораживанием в жидком азоте (режим №1).

Важным моментом для криосохранения клеток мидии было присутствие проникающих через мембрану криопротекторов (ДМСО, метанола, глицерина или этиленгликоля). Без них введение других компонентов криозащитной смеси было неэффективно, хотя в присутствии проникающих криопротекторов выход живых клеток мидии после замораживания–оттаивания составлял около 5%. Жизнеспособность клеток морского ежа, напротив, снижалась при использовании проникающих криопротекторов, поэтому в качестве основного криопротектора в этом случае мы использовали непроникающий

криопротектор, дисахарид трегалозу, позволивший сохранить до 20% живых клеток (оценка с помощью витальных красителей).

Как известно, низкие температуры вызывают перестройку всего клеточного метаболизма (Raison, 1973). При отрицательных температурах может развиваться перекисное окисление липидов (Rosa et al., 2005). В зависимости от температуры окружающей среды в мембранных липидах могут происходить изменения структуры цепей жирных кислот. Липиды в жидкокристаллическом состоянии способны восстанавливать области разрушения или препятствовать повреждению мембраны во время замораживания–оттаивания (Watson, 1981). Добавление к клеткам яичного желтка или холестерина значительно увеличивает стабильность мембран клеток, как позвоночных, так и беспозвоночных животных при различных неблагоприятных воздействиях, в том числе и при замораживании (Darin-Bennet, White, 1977; Watson, 1981; Goncharenko, Katkov, 1985; Katkov et al., 1996; Grout, McFadzen, 1999). Одной из возможных причин такого эффекта может быть снижение перекисного окисления липидов в присутствии экзогенных липидов (Darin-Bennet, White, 1977). Тестирование криопротекторов липидной природы показало, что добавление УЛЭ, холестерина или лецитина к смеси ДМСО и трегалозы (при замораживании клеток мидии) или к трегалозе (при замораживании клеток морского ежа) незначительно влияло на выход жизнеспособных клеток личинок этих животных, тогда как при использовании МЛЭ выход таких клеток увеличивался до 23–35%. Для определения компонента МЛЭ, обладающего криозащитным эффектом, мы разделили его на фракции полярных (МЛЭп) и неполярных (МЛЭнп) липидов. Тестирование этих фракций показало, что введение МЛЭп достоверно не влияло на выход живых клеток после оттаивания, а в присутствии МЛЭнп количество жизнеспособных клеток увеличивалось до 17–26%. Но отдельные фракции МЛЭ не превосходили по своей эффективности общий липидный экстракт.

В настоящее время установлено, что помимо механического разрушения мембран в основе деструктивного действия глубокого замораживания может лежать внутриклеточная генерация активных форм кислорода (АФК). Окислительные повреждения вызваны дисбалансом между генерацией и утилизацией АФК. В норме утилизация обеспечивается необходимым количеством антиоксидантов как внутри, так и снаружи клетки. При замораживании клетка окружена криозащитной смесью, в которой может отсутствовать необходимая концентрация антиоксидантов, и клеточная мембрана становится уязвимой для окислительной атаки (Rosa et al., 2005). Введение антиоксидантов (витамина С, витамина Е, эхинохрома, каталазы, супероксиддисмутазы или восстановленного глутатиона) в любой комбинации в отсутствие каких-либо липидных экстрактов, практически не оказывало влияния на жизнеспособность клеток после оттаивания. Однако значительное повышение жизнеспособности клеток наблюдали при добавлении антиоксидантов в присутствии липидных экстрактов: добавление витаминов С и Е в присутствии МЛЭ позволило получить до 38% жизнеспособных клеток

мидии (в отличие от 25% в присутствии только МЛЭ), а добавление эхинохрома позволило получить до 52% живых клеток морского ежа (в отличие от 34% в присутствии только МЛЭ).

Введение каталазы, супероксиддисмутазы и восстановленного глутатиона, по отдельности и в комплексе друг с другом, в криозащитные смеси, содержащие МЛЭ, показало свою неэффективность в нашем исследовании. В целом, информация по использованию ферментов каталазы и супероксиддисмутазы при криоконсервации противоречива. В одних случаях, их добавление (совместно или по отдельности) оказывалось малоэффективным (Limaye, 1997). Введение супероксиддисмутазы приводило к значительной гибели клеток из-за дополнительной генерации перекиси водорода и сопровождалось фрагментацией молекул ДНК, характерной для апоптоза (Baumber, 2003). В других случаях было отмечено, что введение этих антиоксидантов значительно снижало уровень активных форм кислорода, а, следовательно, способствовало сохранению замораживаемых клеток (Dinara et al., 2001; Rosa et al., 2005). Возможно, противоречивость этих результатов связана с особенностями объектов, выбранных для криоконсервации, либо с раздельным использованием ферментов, функционирующих в клетке совместно.

МТТ-тест клеток личинок моллюсков и иглокожих

Результаты МТТ-тестов показали, что жизнеспособность клеток мидии, замороженных в присутствии ДМСО и трегалозы, через 18 ч после оттаивания составляла 5–6% от уровня положительного контроля (рис. 1). При введении в эту смесь МЛЭ, количество живых клеток возрастало до 25%. При дополнительном введении антиоксидантов, таких как витамины С и Е, процент жизнеспособных клеток мидии увеличивался до 30%. Проверка криозащитных свойств отдельных фракций МЛЭ показала, что добавление фракции полярных липидов в смесь ДМСО и трегалозы не влияет на выход жизнеспособных клеток после оттаивания, этот показатель остается таким же, как и при использовании смеси ДМСО и трегалозы. Введение фракции неполярных липидов МЛЭ повышало количество живых клеток до 15%.

При замораживании клеток морского ежа в присутствии только трегалозы выход жизнеспособных клеток достигал 50% от уровня положительного контроля (рис. 2). Использование трегалозы совместно с МЛЭ позволяло сохранять до 75% жизнеспособных клеток. Между фракциями МЛЭ не было выявлено достоверных отличий: жизнеспособность достигала 58–63%. Таким образом, количество жизнеспособных клеток при введении отдельных фракций не превышало количество таковых при использовании МЛЭ. Наиболее эффективной оказалась криозащитная смесь, состоящая из трегалозы, МЛЭ и эхинохрома: количество жизнеспособных клеток морских ежей после оттаивания достигало 90%.

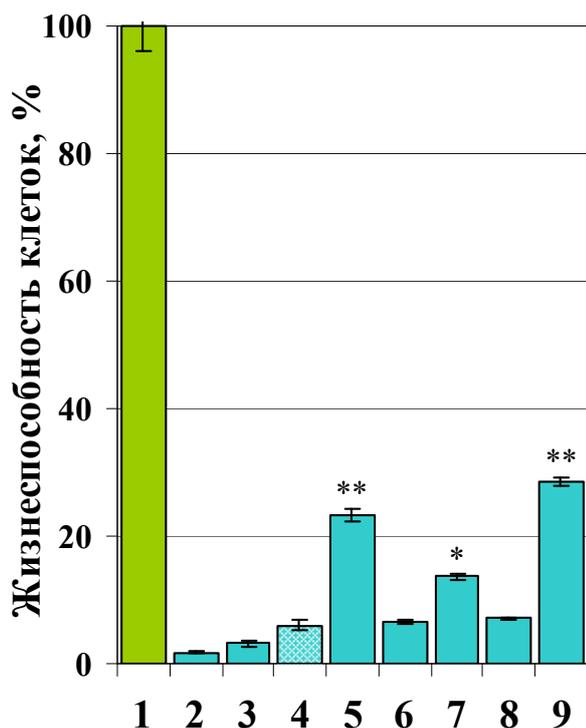


Рис. 1. Жизнеспособность клеток трохофоры мидии *Mytilus trossulus* до и после замораживания–оттаивания (результаты МТТ-теста):

1 – клетки до замораживания (положительный контроль); 2 – среда L-15М (отрицательный контроль); клетки, замороженные в присутствии: 3 – глицерина и трегалозы; 4 – ДМСО и трегалозы; 5 – ДМСО, трегалозы и МЛЭ; 6 – ДМСО, трегалозы и МЛЭп; 7 – ДМСО, трегалозы и МЛЭнп; 8 – ДМСО, трегалозы, витаминов С и Е; 9 – ДМСО, трегалозы, МЛЭ, витаминов С и Е. МТТ введен через час после оттаивания клеток. Инкубация с МТТ – 18 ч при 18°C. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Уровень значимости относительно значения №4: *P < 0.05, **P < 0.01.

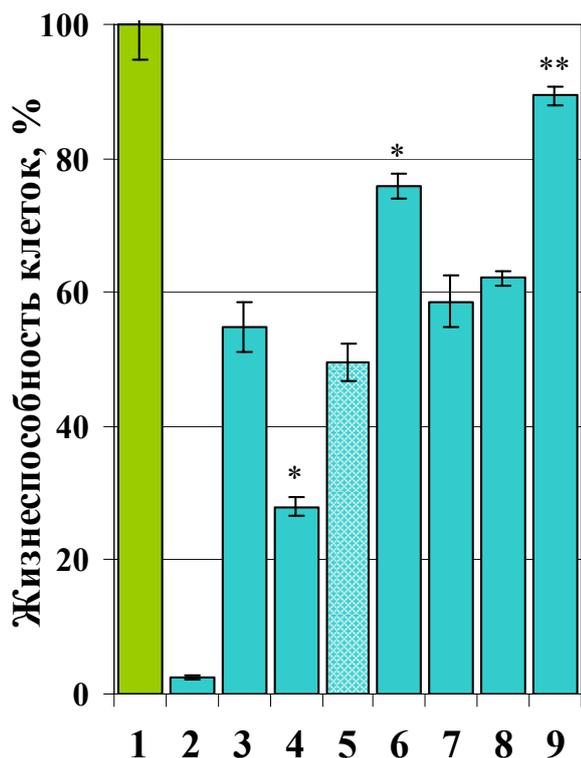


Рис. 2. Жизнеспособность клеток плавающей бластулы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* до и после замораживания–оттаивания (результаты МТТ-теста):

1 – клетки до замораживания (положительный контроль); 2 – среда L-15М (отрицательный контроль); клетки, замороженные в присутствии: 3 – этиленгликоля и трегалозы; 4 – ДМСО и трегалозы; 5 – трегалозы; 6 – трегалозы и МЛЭ; 7 – трегалозы и МЛЭп; 8 – трегалозы и МЛЭнп; 9 – трегалозы, МЛЭ и Эх. МТТ введен через час после оттаивания клеток. Инкубация с МТТ – 18 ч при 18°C. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Уровень значимости относительно значения №5: *P < 0.05; **P < 0.01.

Оценка морфологии и функциональной активности клеток моллюсков и иглокожих

Только жизнеспособные и функционально активные клетки трохофоры мидии *M. trossulus* могут дифференцироваться в культуре (Plotnikov et al., 2003), при этом часть из них может распластываться на субстрате и образовывать агрегаты, способных к спонтанному сокращению (рис. 3 А). Анализ поведения клеток в культуре после оттаивания показал, что клетки, замороженные в присутствии ДМСО и трегалозы, не распластывались даже через несколько суток после оттаивания (рис. 3 Б). Клетки, замороженные в присутствии криопротектора, в состав которого входили ДМСО, трегалоза, МЛЭ и антиоксиданты, уже через сутки после оттаивания распластывались (рис. 3 В). Более того, эти клетки, как и клетки до замораживания, через сутки начинали спонтанно сокращаться.

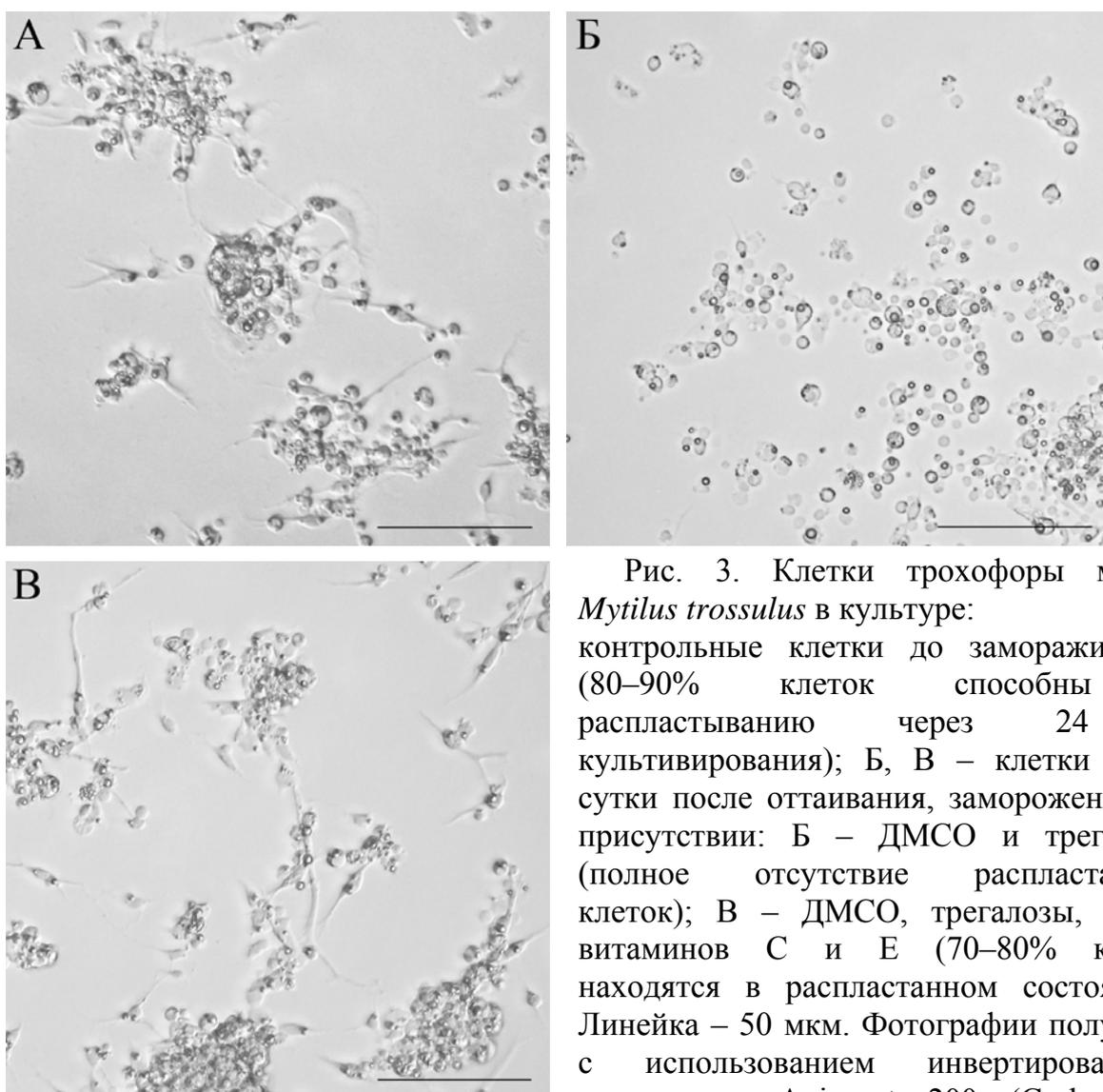


Рис. 3. Клетки трохофоры мидии *Mytilus trossulus* в культуре: А – контрольные клетки до замораживания (80–90% клеток способны к распластыванию через 24 ч культивирования); Б, В – клетки через сутки после оттаивания, замороженные в присутствии: Б – ДМСО и трегалозы (полное отсутствие распластанных клеток); В – ДМСО, трегалозы, МЛЭ, витаминов С и Е (70–80% клеток находятся в распластанном состоянии). Линейка – 50 мкм. Фотографии получены с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Интактные клетки трохофоры мидии *M. trossulus* способны не только распластываться и сокращаться в культуре, но и включать аналоги нуклеотидов в синтезируемую ДНК (Odintsova et al., 2010). Среди клеток, замороженных в присутствии ДМСО и трегалозы, после оттаивания не было обнаружено БДУ-иммуноположительных клеток, что свидетельствует об отсутствии клеток, в которых идет синтез ДНК (рис. 4 А). При использовании криозащитной смеси, состоящей из ДМСО, трегалозы, МЛЭ, витаминов С и Е, часть клеток после оттаивания уже через сутки культивирования была способна включать БДУ (рис. 4 Б).

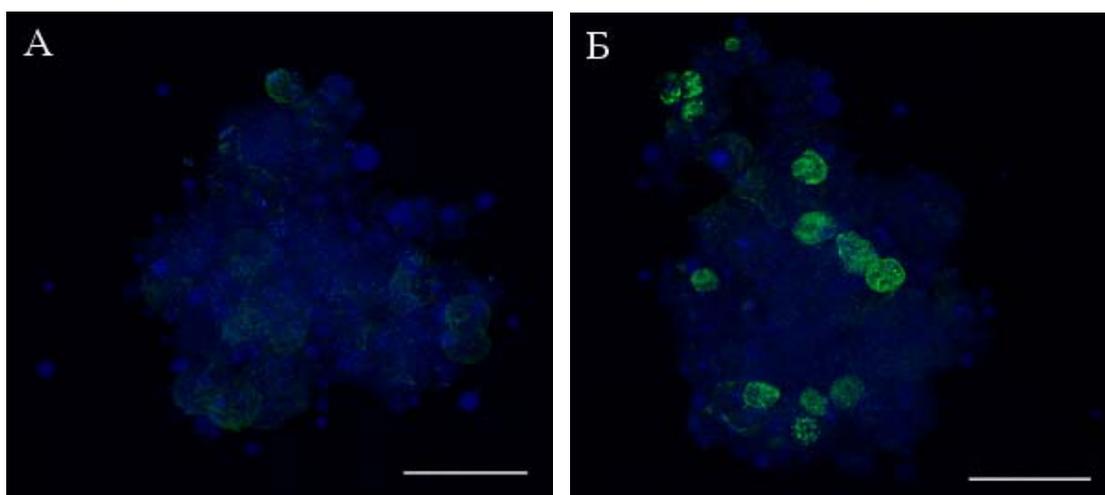


Рис. 4. Присутствие 5-бромо-2'-дезоксинуридин-иммуноположительных клеток (зеленая окраска) личинок мидии *Mytilus trossulus* после замораживания с различными криопротекторами: А – ДМСО и трегалозы; Б – ДМСО, трегалозы, МЛЭ, витаминов С и Е. Ядра клеток окрашены в синий цвет. Клетки культивировали после оттаивания в течение 3 сут. Линейка – 25 мкм. Фотографии получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP5 (Leica, Германия).

В норме клетки бластулы морского ежа прикрепляются к субстрату в течение 24 ч культивирования (Ермак, Одинцова, 1996), часть из них начинает собираться в агрегаты, образуя эмбрионоподобные структуры – эмбриониды (рис. 5 А). После цикла замораживания–оттаивания в присутствии трегалозы и эхинохрома часть клеток сохраняла способность распластываться на субстрате (рис. 5 Б). Через 96 ч культивирования после оттаивания в некоторых случаях наблюдали появление пигментных гранул внутри клеток (рис. 5 В). Клетки после оттаивания, как и интактные клетки, были способны образовывать эмбриониды, которые активно двигались в течение 5–10 сут, в некоторых случаях наблюдали «экзогаструляцию» и образование спикул (рис. 5 Г и Д).

Состав жирных кислот липидов мидии *S. grayanus* и ульвы *U. fenestrata*

Для того, чтобы понять механизм защиты клеточных мембран моллюсков и иглокожих при криоконсервации, мы изучили состав жирных кислот добавляемых экзогенных липидов и провели оценку изменений в липидном составе клеток личинок мидии и морского ежа до и после

замораживания. Результаты анализа жирных кислот липидов мидии *C. grayanus* (общего липидного экстракта и его фракций), ульвы *U. fenestrata*, клеток личинок мидии *M. trossulus* и морского ежа *S. intermedius* до замораживания представлены в таблице 1.

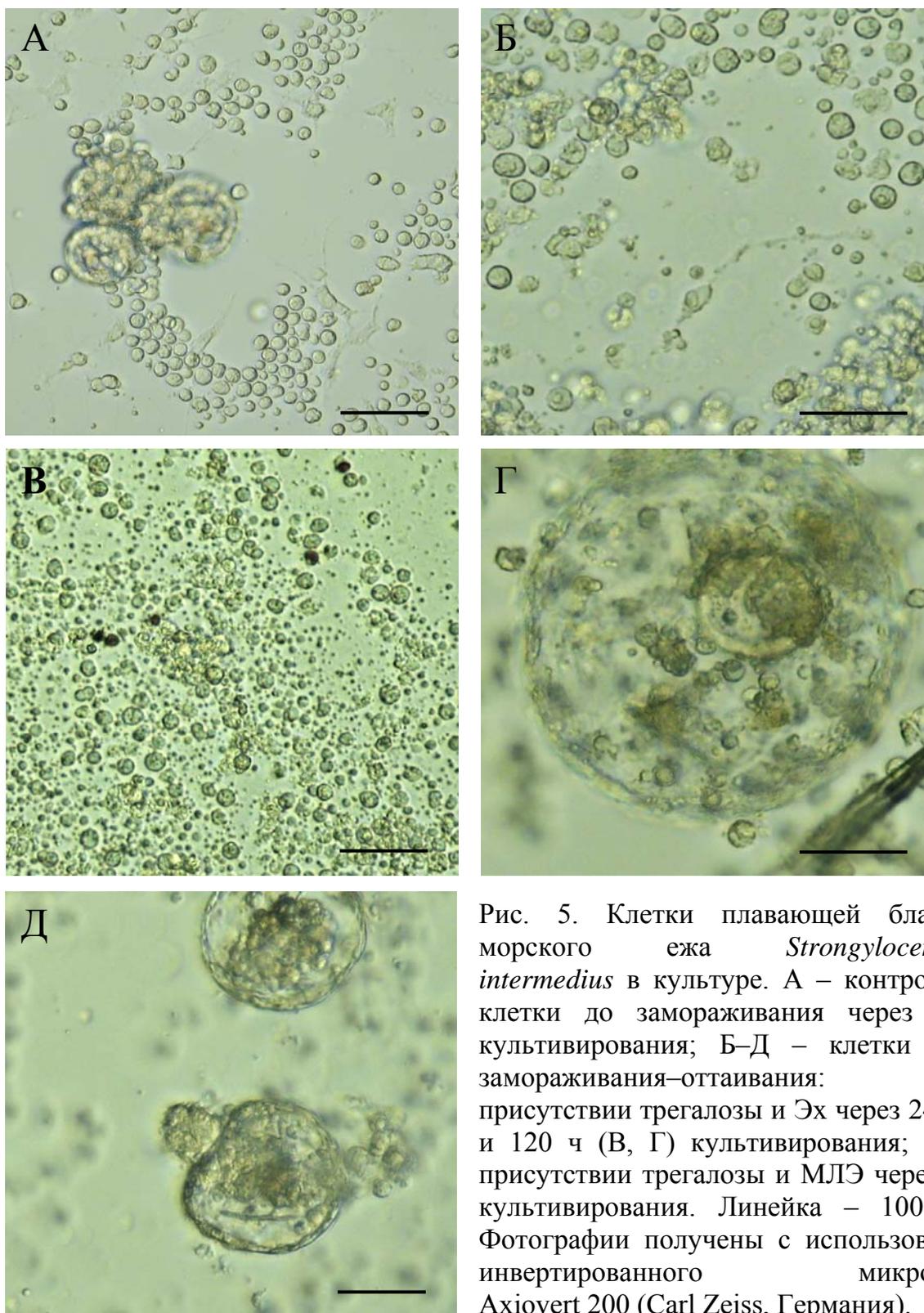


Рис. 5. Клетки плавающей бластулы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в культуре. А – контрольные клетки до замораживания через 24 ч культивирования; Б–Д – клетки после замораживания–оттаивания: в присутствии трегалозы и Эх через 24 ч (Б) и 120 ч (В, Г) культивирования; Д – в присутствии трегалозы и МЛЭ через 96 ч культивирования. Линейка – 100 мкм. Фотографии получены с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Таблица 1. Состав жирных кислот липидов мидии *Crenomytilus grayanus* (МЛЭ), фракции неполярных (МЛЭнп) и полярных липидов *C. grayanus* (МЛЭп), липидов ульвы *Ulva fenestrata* (УЛЭ), клеток *Mytilus trossulus* и *Strongylocentrotus intermedius* до замораживания и основные характеристики этих липидных экстрактов.

	МЛЭ	МЛЭнп	МЛЭп	УЛЭ	Клетки <i>M. trossulus</i>	Клетки <i>S. intermedius</i>
14:0	3.2	3.8	4.5		3.1	2.9
14:1					1.0	
15:0						2.0
16:0	20.6	18.8	19.3	5.9	36.4	19.0
16:1n-9	2.2	13.0	1.2		4.0	3.2
16:4n-3				42.5		
18:0	6.9	2.2	6.9		11.0	13.2
18:1n-9	2.3	4.5	0.8		6.9	3.3
18:1n-7	3.2	5.2	2.5	0.9	1.5	1.4
18:2n-6	1.8	1.8	0.7	1.5	2.5	3.4
18:3n-3				21.2		
18:4n-3				26.4		
20:0					1.3	1.1
20:1n-9						6.3
20:1n-7	6.5	6.3	6.7		2.6	3.0
20:4n-6	4.9	2.3	4.7		1.3	14.5
20:5n-3	24.2	18.7	24.2		12.3	19.1
22:0	0.9	0.6	1.1		2.5	
22:2 NMID	5.1	2.8	5.4			0.9
22:5n-6	1.9	2.5	2.6		1.9	
22:5n-3	2.3	0.8	1.2		1.6	
22:6n-3	9.3	11.4	12.8		5.0	0.9
X	4.6	5.4	5.3	1.7	5.1	5.7
НЖК	31.6	25.4	31.9	5.9	54.3	38.2
МЖК	14.2	29.0	11.2	0.9	16.0	17.2
ПЖК	49.5	40.2	51.5	91.5	24.6	38.9
ИН	246	225	259	343	135	185

Примечание: Содержание ЖК дано в процентах. **НЖК**, насыщенные жирные кислоты; **МЖК**, мононенасыщенные жирные кислоты; **ПЖК**, полиненасыщенные жирные кислоты; ИН, индекс ненасыщенности; «X», неопределенные жирные кислоты. Жирные кислоты с содержанием менее 0.5% не учитывали. Стандартное отклонение было менее 0.5% для трех повторов.

В состав МЛЭ входило 32% насыщенных ЖК (НЖК), 14% моноеновых ЖК (МЖК) и 50% полиеновых ЖК (ПЖК). Основные ЖК в МЛЭ: эйкозапентаеновая (20:5n-3), пальмитиновая (16:0) и докозагексаеновая (22:6n-3). Индекс ненасыщенности (ИН) составил 246.

Заметны явные различия ЖК состава двух фракций МЛЭ. В МЛЭ_{нп} содержание НЖК немного ниже, чем в МЛЭ_п (на 6.5%). Практически в 3 раза выше доля МЖК (29.0 против 11.2%), особенно: 16:1n-9 (13 против 1.2%) и 18:1n-9 (4.5 против 0.8%).

Однако, в МЛЭ_{нп} содержание ПЖК было значительно ниже, чем в МЛЭ_п (40.2 против 51.5%): 20:5n-3 (18.7 против 24.2%), 22:2 NMID (2.8 против 5.4%), 20:4n-6 (2.3 против 4.77%), 22:6n-3 (11.4 против 12.8%). Как следствие, ИН липидов в МЛЭ_п был выше, чем в МЛЭ_{нп} (259 против 225).

В УЛЭ содержалось всего 6 достоверно определяемых жирных кислот: 16:4n-3 (42.5%), 18:4n-3 (26.4%), 18:3n-3 (21.2%), 16:0 (5.9%), 18:2n-6 (1.5%) и 18:1n-7 до 1%. Вследствие высокой доли ПЖК, УЛЭ имел самый высокий ИН среди исследованных экстрактов (343).

Состав жирных кислот липидов клеток трохифоры мидии *M. trossulus*

Проанализированы изменения в липидном составе клеток мидии до и после замораживания в присутствии традиционных криопротекторов (ДМСО и трегалозы) и криозащитных смесей, содержащих помимо ДМСО и трегалозы, экзогенные липиды и антиоксиданты.

Важно отметить, что инкубирование клеток в присутствии ДМСО, трегалозы, МЛЭ (в количестве 0.15% от объема криозащитной смеси) и антиоксидантов до замораживания, практически не повлияло на ЖК состав клеток.

После замораживания–оттаивания в ЖК составе липидов клеток личинок *M. trossulus* происходили весьма существенные изменения, которые зависели от применяемых криопротекторов. В присутствии ДМСО и трегалозы происходило увеличение доли НЖК с 52.7 до 61.6% и снижение ПЖК (с 25.9 до 14.0%): доля 20:5n-3 снижалась с 12.1 до 4.7%, 22:6n-3 с 5.8 до 2.9%, 22:5n-6 с 2.1 до 1.2%, а 20:4n-6 с 1.5 до 1.1%. Сумма МЖК увеличивалась с 16.8 до 20.3%. ИН снижался со 143 до 86.

В присутствии криозащитной смеси, состоящей из ДМСО, трегалозы, МЛЭ, витаминов С и Е, картина менялась. Происходило уменьшение доли НЖК с 52.7 до 33.3%, особенно значительное у 16:0 (с 35.6 до 21.8%). Возрастала доля МЖК (с 16.8 до 31.8%): с 6.3 до 13.6% у 18:1n-9 и с 1.5 до 2.9% у 18:1n-7, и доля ПЖК (с 25.9 до 29.8%). ИН незначительно возрастал: со 143 до 152.

Замораживание клеток сопровождается образованием АФК (Rosa et al., 2005). Чувствительность мембраны к окислительному стрессу, главным образом, определяется количеством ПЖК, подвергающихся перекисному окислению в присутствии АФК, что ведет к потере жирных кислот плазматической мембраной, и, как следствие, к нарушению ее целостности и функций (Мирзоян и др., 2004).

Наблюдается четкий синергизм действия витаминов Е и С, один из этих антиоксидантов связан с клеточной мембраной, а другой находится в водной фазе. После взаимодействия витамина Е с активными формами кислорода, витамин С способен восстанавливать токофероксильный радикал витамина Е, обеспечивая «работоспособность» витамина Е в следующих циклах (Buettner, 1993).

В наших экспериментах была обнаружена отрицательная корреляция между выживаемостью клеток и долей НЖК ($r = -0.9991$) в общих липидах клеток личинок мидии после замораживания–оттаивания в присутствии криозащитных сред различного состава. В тоже время наблюдали отчетливую положительную корреляцию между выживаемостью клеток и количеством МЖК ($r = 0.9926$) и ПЖК ($r = 0.9765$) в липидах этих клеток (рис. 6). Введение дополнительных криопротекторов (экзогенных липидов и антиоксидантов) в смеси, содержащие ДМСО и трегалозу, приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток после оттаивания и, как следствие, снижению доли НЖК, повышению доли МЖК и ПЖК.

Состав жирных кислот липидов клеток бластулы морского ежа *S. intermedius*

До замораживания в экстракте клеток плавающей бластулы *S. intermedius* по сравнению с экстрактом клеток трохофоры *M. trossulus* присутствовало меньше НЖК (38%), но доля ПЖК была выше (39%). ИН в липидных экстрактах клеток бластулы морского ежа был значительно выше (185 против 135, соответственно).

После замораживания в присутствии ДМСО и трегалозы или трегалозы и УЛЭ происходило увеличение доли насыщенных ЖК (с 38 до 43%), при этом сумма моноеновых ЖК уменьшалась (с 17.2 до 14%). Следует отметить снижение доли ПЖК в оттаянных клетках (с 38.9 до 34–35%). Как результат, ИН снижался со 185 до 160.

При замораживании клеток в смеси ДМСО, трегалозы, МЛЭ и эхинохрома, происходило незначительное снижение НЖК с 38 до 36.6%, в основном за счет уменьшения доли 18:0 (с 13.2 до 9.9%). Доли индивидуальных МЖК и ПЖК, и, как следствие, ИН практически не изменялись.

Замораживание в криозащитной смеси, содержащей трегалозу, МЛЭ и эхинохром, приводило к небольшому увеличению насыщенных ЖК (с 38.2 до 39.3%), однако доля 18:0 снижалась (с 13.2 до 11.7%). Доля МЖК увеличивалась (с 17.2 до 18.2%). Общая сумма ПЖК снижалась с 38.9 до 37.7% за счет снижения доли 20:4n-6 (с 14.5 до 13.3%), 20:5n-3 (с 19.1 до 18.5%). ИН практически не изменялся.

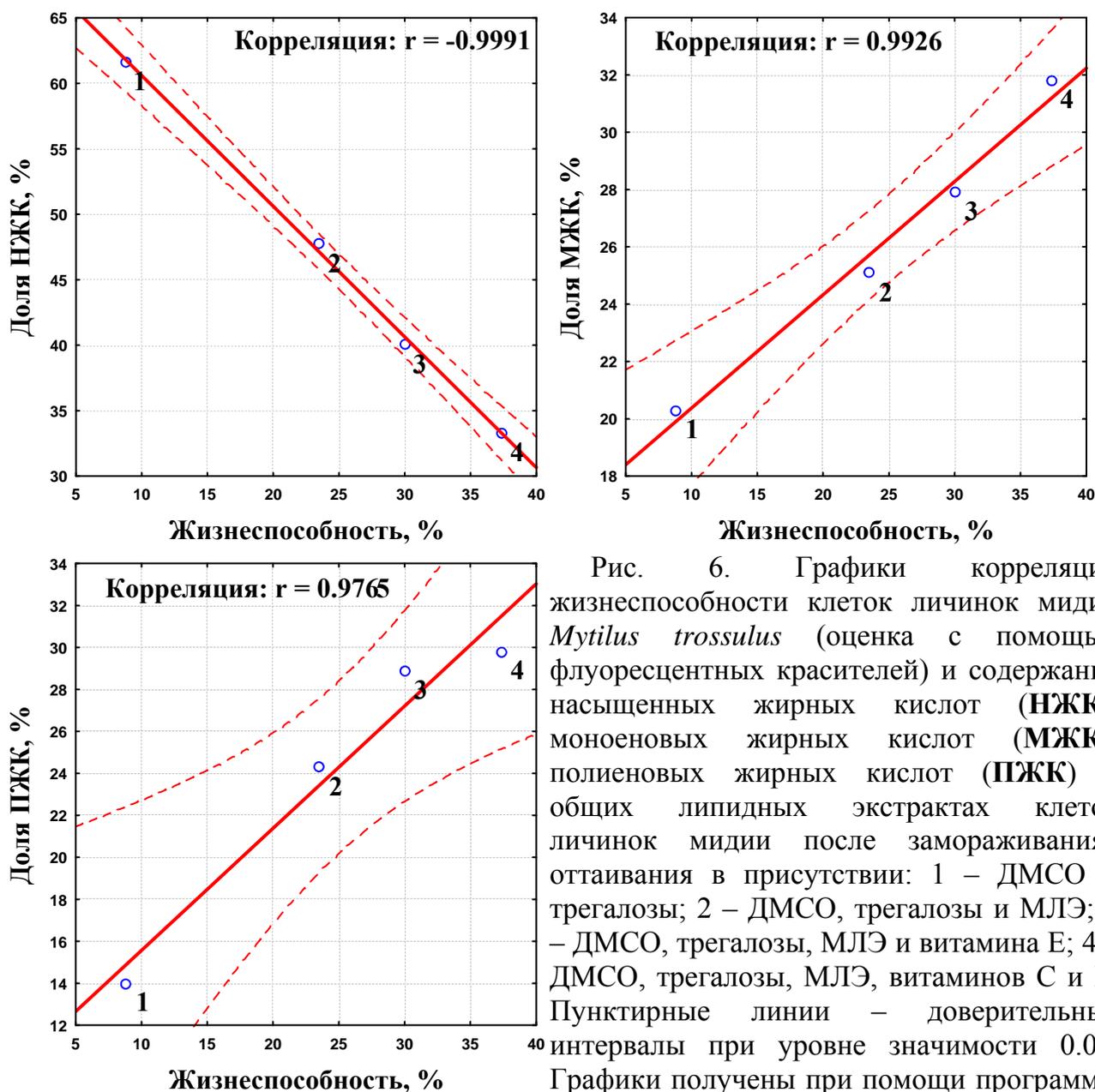


Рис. 6. Графики корреляции жизнеспособности клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* (оценка с помощью флуоресцентных красителей) и содержания насыщенных жирных кислот (НЖК), моноеновых жирных кислот (МЖК), полиеновых жирных кислот (ПЖК) в общих липидных экстрактах клеток личинок мидии после замораживания–оттаивания в присутствии: 1 – ДМСО и трегалозы; 2 – ДМСО, трегалозы и МЛЭ; 3 – ДМСО, трегалозы, МЛЭ и витамина Е; 4 – ДМСО, трегалозы, МЛЭ, витаминов С и Е. Пунктирные линии – доверительные интервалы при уровне значимости 0.05. Графики получены при помощи программы Statistica v.6 (StatSoft Inc., 2001).

Анализ состояния криозащитных смесей при замораживании

Основные повреждения клеточных структур в период замораживания прямо или косвенно связаны с образованием кристаллов льда (Белоус и др., 1987). По форме и размеру частиц льда, образующихся в среде, можно косвенно судить о возможных повреждениях клеток при замораживании. Чем более округлые и менее упорядоченные частицы, тем меньше повреждений клеток они вызовут, однако, формирование кристаллов льда внутри клеток является губительным (Bank, Mazur, 1973). Для прояснения механизмов повреждения клеток при замораживании–оттаивании в присутствии криозащитных смесей различного состава, необходимо, прежде всего, знать какие процессы протекают в самих смесях, и какое влияние оказывает каждый отдельный компонент на процессы образования, роста и перекристаллизации частиц льда. Было проведено тщательное наблюдение за этими процессами, протекающими при замораживании морской воды с добавлением ДМСО,

трегалозы и МЛЭ (6.7, 13.3 и 0.07%, соответственно), исследованы температуры замораживания и плавления этих смесей.

Кривые кристаллизации и плавления криозащитных смесей при замораживании–оттаивании представлены на рисунке 7 (А и Б, соответственно). Температура замораживания морской воды, на основе которой готовились криозащитные смеси, составляла -1.6°C . При замораживании происходило переохлаждение криозащитных сред на $5-8^{\circ}\text{C}$ ниже температуры кристаллизации, за исключением среды с МЛЭ. В присутствии эмульсии липидов не происходило переохлаждения среды, вероятнее всего, липиды служили центрами начала кристаллизации. Более того, эта смесь не обладала определенной температурой кристаллизации. Введение ДМСО снижало температуру кристаллизации морской воды на 3°C , а введение трегалозы – на 0.6°C . При таянии большинства сред отчетливой точки плавления не наблюдали. Возможно, это связано с многокомпонентностью растворов. Плавление криозащитной среды, содержащей морскую воду и МЛЭ, происходило в широком диапазоне температур (от -11 до -2°C). Вероятно, такие широкие диапазоны температур кристаллизации и плавления способствуют плавному формированию и росту кристаллов льда в криозащитной среде, содержащей липиды.

Рост частиц льда при замораживании морской воды происходил в одном направлении, концы частиц имели заостренную форму. Такой вид твердая морская вода сохраняла до температуры перекристаллизации частиц льда. При температуре -108°C заметно образование расколов, что является началом формирования более крупных частиц льда (перекристаллизации). Температура начала формирования сколов, главным образом, зависит от жесткости субстрата (Rabin et al., 2006). Чем ниже жесткость субстрата, тем ниже температура начала формирования сколов. При температуре жидкого азота происходило окончательное формирование частиц льда. Подобную картину наблюдали при замораживании криозащитной среды, содержащей трегалозу.

Рост частиц льда при замораживании криозащитных сред, содержащих МЛЭ, происходил в нескольких направлениях, ветви имели несимметричную форму, а края частиц были округлые.

Наши результаты подтверждают литературные данные о влиянии некоторых экзогенных липидов на рост кристаллов льда при сверхнизких температурах: кристаллы имеют более сглаженные края и меньший размер, а при высоких концентрациях экзогенных липидов совсем не образуются (Андреев и др., 2008).

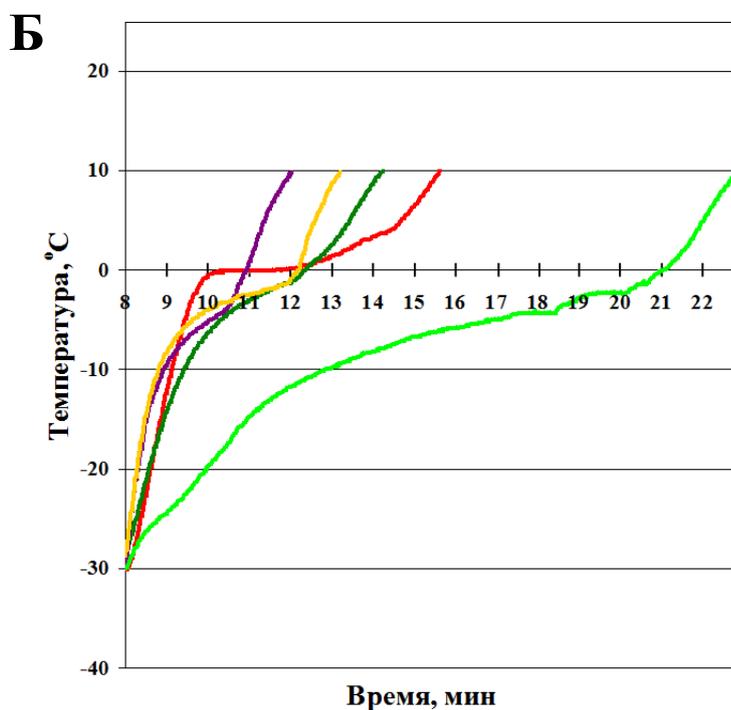
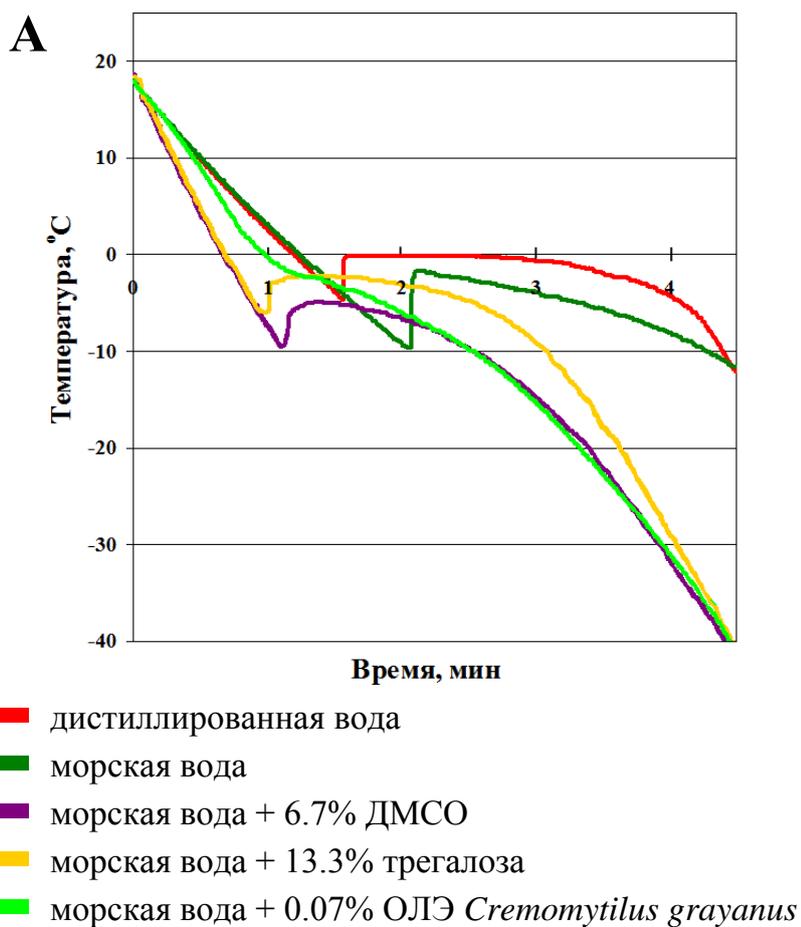


Рис. 7. Кинетика процесса замораживания–оттаивания криозащитных смесей различного состава. А – замораживание, Б – оттаивание. Температуру образцов измеряли с помощью электронного термометра UT-320 (Uni-Trend, Гонконг) со специально разработанной термопарой.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что оптимальным режимом замораживания клеток трохофоры мидии *Mytilus trossulus* является постепенное охлаждение с 4 до -33°C со скоростью $-2.5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим погружением в жидкий азот. Для замораживания клеток плавающей бластулы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* наиболее эффективным является охлаждение с 4 до -80°C со скоростью $-4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и погружение в жидкий азот. Впервые обнаружено, что наиболее плавно процесс кристаллизации происходит в среде, содержащей экзогенные липидные экстракты, при этом формирующиеся частицы льда имеют более сглаженные края и меньший размер.
2. Установлено, что замораживание–оттаивание клеток личинок моллюсков и иглокожих в присутствии только традиционных криопротекторов (ДМСО и трегалозы) приводит к разрушению и гибели более 80% клеток. Антиоксиданты, как отдельные компоненты криозащитной смеси, не обладают защитным действием. Присутствие проникающих криопротекторов принципиально для криосохранения клеток моллюсков, тогда как для клеток иглокожих использование этого типа криопротекторов неэффективно.
3. Показано, что введение в криозащитную смесь эмульсии липидов из тканей мидии *Crenomytilus grayanus* в комплексе с антиоксидантами (витаминами С и Е – при замораживании клеток личинок мидии *M. trossulus*, эхинохромом – при замораживании клеток личинок морского ежа *S. intermedius*) позволяет сохранять жизнеспособными до 40% клеток мидии и до 90% клеток морского ежа. Липиды из тканей зеленой водоросли *Ulva fenestrata* обладали меньшим защитным действием.
4. Установлено, что функциональная активность клеток личинок моллюсков и иглокожих может быть восстановлена после замораживания в жидком азоте: клетки трохофоры мидии сохраняют способность к адгезии, образованию агрегатов сокращающихся клеток и пролиферативной активности в культуре; клетки плавающей бластулы морских ежей способны к образованию эмбрионов, к дифференцировке в пигментные клетки и клетки, продуцирующие спикулы.
5. Обнаружены значительные различия в составе жирных кислот липидов клеток личинок до и после замораживания. При использовании традиционных криопротекторов (при большом количестве погибших клеток) в липидных экстрактах клеток после размораживания присутствует большое количество насыщенных жирных кислот по сравнению с таковым в клетках до замораживания. В случае использования криозащитных сред, содержащих экзогенные липиды и антиоксиданты, одновременно с увеличением доли выживших клеток возрастает и доля ненасыщенных жирных кислот.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах из списка рекомендованного ВАК:

1. Одинцова Н.А., Борода А.В., Санина Н.М., Костецкий Э.Я. Создание Криобанка клеток и личинок морских беспозвоночных // Ветеринарная патология. 2007. № 3 (22). С. 254–256.
2. Костецкий Э.Я., Борода А.В., Одинцова Н.А. Изменения липидного состава эмбриональных клеток мидии *Mytilus trossulus* в процессе криоконсервации // Биофизика. 2008. Т. 53, № 4. С. 658–665.
3. Odintsova N.A., Boroda A.V., Velansky P.V., Kostetsky E.Ya. Fatty acid profile changes of embryonic cells of marine invertebrates during cryopreservation // Cryobiology. 2009. V. 59. P. 335–343.

Патент Российской Федерации:

1. Одинцова Н.А., Борода А.В., Агеенко Н.В., Костецкий Э.Я. Способ криосохранения клеток морских беспозвоночных // Патент на изобретение № 2314687. М., 2008. Бюлл. № 2.

Публикации в материалах конференции:

1. Одинцова Н.А., Агеенко Н.В., Борода А.В., Костецкий Э.Я. Новые криопротекторы – важнейший этап на пути создания криобанка морских беспозвоночных // Международная научная конференция "Инновации в науке и образовании – 2005", 19–21 октября: Труды научной конференции. Ч. 1. Калининград: Изд-во КГТУ, 2005. С. 79–80.
2. Одинцова Н.А., Борода А.В., Костецкий Э.Я. Создание единого низкотемпературного генетического банка (криобанка) на Дальнем Востоке для хранения половых продуктов, эмбрионов, личинок и клеток морских беспозвоночных // Перспективные направления развития нанотехнологий в ДВО РАН: Рабочее совещание: доклады, Владивосток, 16 июня 2007 г. Владивосток: ИАПУ ДВО РАН, 2007. С. 113–124.
3. Борода А.В., Одинцова Н.А., Костецкий Э.Я. Изменение липидного состава эмбриональных клеток морских беспозвоночных в процессе криоконсервации // Биофизика живой клетки. 2008. Т. 9. С. 29. [Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: Материалы конференции (Пушино, 28–30 октября 2008 г.)].
4. Борода А.В., Одинцова Н.А. Криоконсервация эмбриональных клеток моллюсков и иглокожих // Цитология. 2008. Т. 50. С. 797. [Всероссийская школа по клеточной биологии. С.Петербург (6–11 октября 2008): Тезисы докладов]
5. Boroda A.V., Odintsova N.A., Kostetsky E.Y. Cryoresistance study of marine hydrobiontes and Cryobank foundation // 1st Far-Eastern International Symposium on Life Sciences. Vladivostok, September, 2–7, 2008: Abstracts. Vladivostok, 2008. P. 15.
6. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., Дячук В.А., Борода А.В. Стволовые клетки морских беспозвоночных: регуляция пролиферации и направленной дифференцировки *in vitro*. Криосохранение // Информационный бюллетень «Клеточные культуры» (С.Петербург). 2008. № 23. С. 23–30.
7. Boroda A.V., Andreev A.A., Kostetsky E.Ya., Odintsova N.A. The search of new cryoprotective compounds for marine invertebrate cells // CRYO 2009. 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology. July 19–23, 2009, Sapporo, Japan. P. 212.

БОРОДА
АНДРЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТОВ НА
ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК
ЛИЧИНОК МОЛЛЮСКОВ И ИГЛОКОЖИХ ПОСЛЕ
КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ