

РАЙДАН Мазен

**ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ
НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
К ПОВРЕЖДАЮЩЕМУ ДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ
ТЕМПЕРАТУР**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Пинаев Георгий Петрович
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Михельсон Виктор Михайлович
Институт цитологии РАН

доктор биологических наук
Васильев Андрей Валентинович
Институт биологии развития
им. Н.К.Кольцова РАН

Ведущая организация: Институт биофизики клетки РАН

Защита диссертации состоится «24» июня 2011 года в 15 часов на заседании
Диссертационного совета Д. 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

Адрес электронной почты Института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан «24» мая 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В.Каминская



1.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность проблемы

Во второй половине двадцатого столетия в медицине возникло новое направление, интенсивно развивающееся в настоящее время и связанное с применением низких температур при лечении различных заболеваний человека и в косметических целях. Эти методы воздействия получили название криотерапии и криохирургии и используются в клинической практике для удаления пигментных и родимых пятен, возрастных кератозов, рубцовых деформаций (Сандомирский, 1987). Эти методы применяют также в хирургии для лечения разных онкологических заболеваний (Egbert, Schwartz, Walsh 1996). Кроме того, было замечено, что такой метод лечения приводит к более быстрому заживлению ран после хирургического вмешательства, в том числе, и к образованию менее заметных шрамов. Исследователи, изучавшие влияние низких температур на деструкцию клеток обратили внимание на то, что оптимальная скорость охлаждения для клеток разных тканей различна (Mazur, 1977; Mc Grath, 1974; Teryman, 1974). Авторы, изучавшие действие низких температур на организм, выдвигают разные предположения по поводу причин различной устойчивости клеток. К ним относят, например, такие особенности, как степень гидрофильности клеточной мембраны (Scott et al., 2005; Byrant et al., 1989), изменение структуры клетки в результате неравномерного осмотического стресса при охлаждении (Batysky et al., 1997), степень образования кристаллов льда внутри клетки или в ее окружении (Guenther et al., 2006; Mazur et al., 2008), обратимая или необратимая денатурация белков (Bischov et al., 2005), изменение синтеза и локализации внутриклеточных высокомолекулярных криопротекторов (Breton et al., 2000) и в первую очередь, белков теплового шока при гипотермии (Alegna et al., 2005).

Согласно представлениям медиков, применяющих воздействие паров жидкого азота для омоложения кожного покрова, этот процесс осуществляется за счет разрушения «старых», дифференцированных, клеток и сохранения «юных» недифференцированных, способствующих его регенерации

На сегодняшний день все высказанные соображения являются только предположениями. Все существующие подходы к лечению болезней с помощью криохирургии сформировались на основе данных классической криобиологии и методов, разработанных для криоконсервации клеток. Вместе с тем до настоящего времени конкретные механизмы разной устойчивости клеток и тканей организма к действию низких температур остаются невыясненными и требуют систематического изучения.

В частности, в высшей степени актуальной и востребованной задачей является выяснение, действительно ли устойчивость клеток к действию низких температур может зависеть от степени их дифференцировки. Для получения ответа на этот вопрос необходимо было провести сравнительное исследование сохранения жизнеспособности клеток разных типов, находящихся на разных стадиях дифференцировки после воздействия на них низких температур при разных режимах охлаждения.

1.2 Цели и задачи работы

Целью данной работы являлось выявление степени устойчивости к действию низких температур нормальных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, а также трансформированных и опухолевых клеток.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Найти оптимальные режимы охлаждения кератиноцитов, при которых только часть исследуемой популяции клеток теряла жизнеспособность, а остальные сохраняли бы способность к росту и дифференцировке в культуре.

2. Определить различия в соотношении между дифференцированными и недифференцированными кератиноцитами в гетерогенной популяции клеток, до и после воздействия на них низких температур.

3. Выявить различия в устойчивости стромальных клеток костного мозга (СККМ) к действию низких температур до и после их направленной дифференцировки в адипоцитарном и остеогенном направлениях.

4. Провести сравнительный анализ устойчивости к действию низких температур нормальных кератиноцитов, клеток постоянной линии А 431, полученной из эпидермоидной карциномы человека, и свежевыделенных опухолевых клеток EHS. саркомы мыши.

5. Определить содержание белка теплового шока HSP70 в дифференцированных и недифференцированных кератиноцитах до и после воздействия на них холодом.

1.3 Основные положения, выносимые на защиту

1. Кератиноциты кожи человека обладают различной устойчивостью к действию низких температур в зависимости от степени их дифференцировки. Наибольшую устойчивость имеют недифференцированные и транзиторные кератиноциты по сравнению с дифференцированными.

2. Выявленная повышенная устойчивость к низким температурам характерна и для других стволовых клеток. Так, устойчивость СККМ к воздействию холодом снижается по мере их направленной дифференцировки в адипоцитарном и остеогенном направлениях.
3. Устойчивость к действию низких температур у свежевыделенных опухолевых клеток сопоставима с устойчивостью СККМ, а у клеток постоянной линии A431 эпидермоидной карциномы она значительно ниже.
4. Возможной причиной различия в устойчивости к охлаждению кератиноцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки, может быть разный уровень синтеза белка теплового шока HSP70. Содержание его в недифференцированных клетках после холодового воздействия значительно выше по сравнению с контролем, в то время как в дифференцированных его содержание минимально.
5. Стволовые клетки разного происхождения обладают повышенной устойчивостью к холоду по сравнению с дифференцированными клетками. При этом существенное значение имеют как режим охлаждения, так и состояние, в котором клетки подвергаются охлаждению.

1.4 Научная новизна полученных результатов

В данной работе впервые проведен сравнительный анализ устойчивости клеток разного происхождения к низким температурам в зависимости от степени их дифференцировки. Установлено, что недифференцированные клетки являются более устойчивыми к воздействию низких температур по сравнению с дифференцированными. Впервые показано также, что степень устойчивости к такому воздействию свежевыделенных опухолевых клеток из EHS саркомы сопоставима с устойчивостью стромальных клеток костного мозга. Наряду с этим клетки постоянной линии A431, полученные из эпидермоидной карциномы, обладают резко сниженной устойчивостью к охлаждению по сравнению со стволовыми и опухолевыми

1.5 Теоретическое и практическое значение работы

Результаты проведенных исследований имеют фундаментальное значение, для расширения современных представлений об устойчивости к действию холода клеток разного тканевого происхождения и разной степени дифференцировки. Полученные данные являются основой для дальнейших исследований защитных механизмов, обеспечивающих повышенную устойчивость недифференцированных клеток к низким температурам. Они также могут быть полезными и для практического применения в криохирургии, в том числе

для расчета таких оптимальных режимов воздействия низкими температурами на ткани человека, которые, разрушая опухолевые клетки, должны сохранять жизнеспособность нормальных клеток, окружающих опухоль, чтобы способствовать дальнейшей регенерации ткани. Различия в устойчивости клеток к действию низких температур могут быть использованы для селективного обогащения гетерогенных клеточных популяций недифференцированными клетками с целью их дальнейшего использования в регенеративной медицине. Обнаруженные закономерности и выводы из работы могут быть использованы в лекционных курсах высших учебных заведений медицинского и биологического профилей.

1.6 Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах и 3 тезисов.

Материалы диссертации были представлены на Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (МГУ, Москва, 25-28 октября 2010г.); на IV ежегодной научно-практической конференции с международным участием "Новое в практической криомедицине» (Москва, 9 ноября 2010г.); на 15-м Всемирном конгрессе Международного общества криохирургии (Санкт Петербург, 1-4 октября, 2009г.).

1.7 Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего ___ источников. Диссертация изложена на ___ страницах машинописного текста. Иллюстративный материал содержит ___ рисунков и ___ таблиц.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выделение и культивирование кератиноцитов

Выделение кератиноцитов проводили по методу Рейнвальда (Rheinwald, 1980) с модификацией (Юдинцева и др., 1999) из фрагментов кожи, полученных в результате коррегирующих операций в области лица и груди от здоровых доноров 40–45 лет.

Клетки в концентрации $14\text{--}15 \times 10^4$ кл/см² вносили в чашки Петри, предварительно покрытые коллагеном I типа, получаемого из сухожилий крысиных хвостов (Chandrakasan et

al., 1967), и культивировали в среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и митогенов при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Смену среды проводили через каждые 3–4-е суток культивирования.

2.2. Выделение и культивирование стромальных клеток костного мозга (СККМ) крысы

В работе были использованы беспородные крысы двухмесячного возраста. Для выделения костного мозга брали бедренные кости, отсекали эпифизы выделяли ядродержащие клетки и культивировали в среде α MEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), смесь пенициллина и стрептомицина (1:100, Invitrogen, Великобритания) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Подсчет клеток проводили в камере Горяева под инвертированным микроскопом. Клетки пересевали, используя смесь 0.25%-ного раствора трипсина и 0.02%-ного раствора версена в PBS (137 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 1.5 M KH₂PO₄, 2.7 mM KCl) (Invitrogen, Великобритания).

2.3. Выделение и культивирование клеток опухоли EHS из мышечной линии Balb.

Суспензию клеток перевиваемой саркомы EHS (Englebreth-Holm-Swarm) (Kibbey, 1994) вводили под кожу мышам линии Balb. После образования опухолей мышечной умерщвляли, затем иссекали опухоль и очищали её от некротизированной ткани. Далее нарезанные мелкие фрагменты помещали в колбу с раствором трипсина в концентрации 0.125 % и проводили диссоциацию фрагментов на магнитной мешалке в течение 20 мин. Обработку трипсином повторяли трижды. Полученную фракцию клеток осаждали центрифугированием (600 g, 5 мин). Осажденные клетки суспендировали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров (Gibco, США) и смесь пенициллина и стрептомицина (1:100, Invitrogen, Великобритания). клетки поддерживали в культуре в течение 10–14 дней при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

2.4. Направленная дифференцировка СККМ в адипоцитарном или остеогенном направлении

Для индукции адипоцитарной дифференцировки использовали метод (Reyes et al., 2001). Суспензию СККМ (2×10^4 кл/см²) культивировали в среде, содержащей 90 % среды α MEM, 10 % лошадиной сыворотки (Sigma, США), 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 10^{-9} М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл аскорбината натрия (ICN,

США), 1-кратный раствор ITS (100-кратный раствор, включает инсулин, трансферрин, селенит натрия (Invitrogen, Великобритания), 1-кратный раствор LA-BSA (100-кратный раствор, содержит 1 мкг/мл линолевой кислоты и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина) (Sigma, США). Индукцию дифференцировки осуществляли в течение 2 нед. Смену среды проводили каждые 3–4-е сутки. Степень дифференцировки клеток оценивали по содержанию в них липидов (Reyes et al., 2001). Краситель жировой красный (Sigma, США) готовили непосредственно перед окрашиванием клеток. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом, ополаскивали дистиллированной водой и сушили на воздухе.

Для индукции дифференцировки в остеогенном направлении суспензию СККМ (1×10^4 кл/см²) переносили в индуцирующую среду, содержащую 90 % α MEM, 10 % лошадиной сыворотки (Sigma, США), 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, Великобритания), 10^{-8} М дексаметазона (Sigma, США), 50 мкг/мл аскорбината натрия (ICN, США), 10 мМ β глицерофосфата натрия (Sigma, США), и культивировали в течение 2 нед. Смену среды проводили каждые 3–4-е сутки культивирования.

Степень дифференцировки клеток оценивали по интенсивности окраски на щелочную фосфатазу смесью BCIP-NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)–(нитросиний тетразолий) (Sigma, США) в течение 20–40 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты 3–4 раза промывали дистиллированной водой и высушивали.

2.5. Методы определения жизнеспособности клеток

2.5.1. Определение жизнеспособности кератиноцитов

Жизнеспособность популяции кератиноцитов после воздействия на них низких температур оценивали по способности клеток к образованию многослойного пласта и времени, необходимого для осуществления этого процесса.

2.5.2. Фотокolorиметрический метод оценки доли жизнеспособных клеток СККМ до и после их охлаждения

Долю жизнеспособных клеток, распластанных на поверхности культурального сосуда, дифференцированных и недифференцированных СККМ, A431 и клеток опухоли EHS саркомы мыши до и после охлаждения определяли методом фотокolorиметрического анализа с помощью анализатора «Charity» (ООО СКБ Пробанаучприбор, Россия). Оптическую плотность красителя – генциан-виолета, связанного с клеточными белками, измеряли при длине волны 570 нм. Предварительно была построена калибровочная кривая, с помощью которой по величине оптической плотности растворов в лунках судили о

количестве жизнеспособных клеток. Каждый опыт повторяли 4–5 раз. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы MS Excel. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

2.6. Исследуемые объекты и режимы их охлаждения

Воздействию низких температур подвергали: кератиноциты кожи человека, стволовые клетки костного мозга крысы, клетки постоянной линии A431 эпидермоидной карциномы человека и клетки опухоли EHS мыши линии Balb.

2.6.1. Охлаждение клеток кожи человека

Действию низких температур подвергали цельные фрагменты кожи, эпидермис, после его отделения от дермы, и кератиноциты, выделенные из эпидермиса в виде суспензии или в виде осадка после центрифугирования. Обработку исследуемых объектов холодом проводили двумя способами: путем прямого воздействия паров жидкого азота на клетки, используя чашки Петри с перфорированными крышками, и путем охлаждения чашек Петри с цельными крышками.

Охлаждение объектов проводили парами жидкого азота в камере программного замораживателя (Ice cube 1810, CSYLAB, Австрия) с электронным блоком контроля. Скорость снижения температуры, до -10 , -20 и -30 °C составляла 5 °C в мин, а до -40 °C и ниже до 12 °C в мин.

Испытывали действие следующих низких температур: -10 , -20 , -30 , -40 , -50 , -60 и -70 °C. К оптимальным температурам относили те, которые подавляли жизнеспособность гетерогенной популяции кератиноцитов, но в то же время не вызывали их полной гибели. После достижения заданной температуры образцы клеток выдерживали в этих условиях в течение 1, 3, 5 и 10 мин.

2.6.2. Охлаждение СККМ крысы и опухолевых клеток

Действию охлаждения подвергали СККМ до и после их дифференцировки в адипоцитарном или остеогенном направлении, клетки постоянной линии A431 эпидермоидной карциномы и свежевыделенные опухолевые клетки из EHS саркомы мыши (Kibbey, 1994). Во всех случаях клетки охлаждали в криоампулах в двух вариантах: в виде суспензии и в виде осадка после их центрифугирования. Концентрация клеток в каждой криоампуле составляла 60 тыс/мл. Был использован такой же диапазон низких температур, как при обработке кератиноцитов. Время охлаждения клеток после окончательного определения оптимальной температуры всегда составляло 5 мин. Количество

жизнеспособных клеток после охлаждения в каждом варианте определяли методом фотоколориметрического анализа.

2.7. Иммунофлуоресцентный анализ степени дифференцировки кератиноцитов

Степень дифференцировки кератиноцитов в популяции клеток определяли методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью антител к соответствующим кератинам, являющимся маркерами определенной стадии дифференцировки.

Для проведения иммунофлуоресцентного анализа покровные стекла обрабатывали коллагеном I типа в количестве 1мкг/мл в течение ночи. Затем на стекла наносили суспензию исследуемых клеток в концентрации 3×10^5 на стекло и выдерживали в течение 3 ч или 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Эти сроки выбраны не случайно – ранее в Отделе клеточных культур было показано (Спичкина и др., 2006), что в течение 3 часов культивирования адгезируют недифференцированные клетки, а за 24 часа к субстрату прикрепится уже вся популяция кератиноцитов. Неприкрепившиеся клетки удаляли, а распластаные фиксировали 4 %-ным раствором формальдегида (Sigma, США) и обрабатывали специфическими антителами. В качестве первых антител использовали моноклональные антитела против следующих кератинов человека (Novocastra laboratories Ltd., Великобритания): K19 – маркер стволовых кератиноцитов (в разведении 1:100), K14 – маркер транзиторных клеток (в разведении 1:50), K10 – маркер дифференцированных клеток (в разведении 1:100).

В качестве вторых антител использовали поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши, конъюгированные с FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (rabbit anti-mouse IgG FITS-Conjugate, Sigma, США) в разведении 1:250.

Для выявления структур актинового цитоскелета использовали родамин-фаллоидин (Molecular probes, США). Идентификацию окрашенных клеток проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм и HeNe-лазер с длиной волны 543 нм. Применяли раздельное сканирование для каждого сигнала. Совмещение двух сигналов проводили с помощью компьютерной программы Leica Confocal Software.

Соотношение клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, определяли с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа (Leica Karl Zeiss, Германия) путем подсчета окрашенных клеток (по 100 клеток в 6 разных полях зрения).

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Image J. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

2.8. Стриппинг многослойного пласта кератиноцитов и снятие клеток базального слоя

За сутки до опыта ростовую питательную среду заменяли средой DMEM/F12 (Sigma, США) с пониженным содержанием ионов Ca^{2+} (0.1 мМ) для того, чтобы произвести дестратификацию, то есть, отслоение и удаление супрабазальных слоев дифференцированных клеток (Jensen, Volund, 1988). Оставшиеся прикрепленными к поверхности культурального сосуда клетки базального слоя промывали 0.02 %-ным раствором ЭДТА, затем открепляли от подложки смесью растворов 0.25 %-ного трипсина и 0.02 %-ного ЭДТА в соотношении 1:1 в течение 2–3 мин при 37 °С. Полученную суспензию клеток пипетировали и осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клетки промывали PBS и повторно центрифугировали. После удаления супернатанта осадок клеток суспендировали в среде DMEM/F12, и они могли быть использованы для выделения белков теплового шока.

2.9. Определение содержания в клетках белков теплового шока

Для определения содержания в клетках белков теплового шока были использованы как супрабазальные слои многослойного пласта кератиноцитов, так и клетки базального слоя. Клетки базального слоя в этом случае отделяли от поверхности культурального сосуда механически при помощи скребка и помещали в раствор PBS.

Кератиноциты супрабазальных и базального слоев промывали дважды раствором PBS с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 600g. Супернатанты удаляли и полученные осадки суспендировали в лизирующем буфере в объеме в 2 раза большем, чем объем осадка. Лизирующий буфер готовили на дистиллированной воде. Он содержал: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 0.5 %-ный Тритон X100, ингибиторы протеаз, 100 мМ PMSF, 1М ДДТ для расщепления дисульфидных связей. Затем снова центрифугировали со скоростью 13 тыс.об/мин, 15 мин при температуре +4 °С.

Полученные супернатанты переносили в новые пробирки и добавляли в них в зависимости от полученного объема 4-кратный объем ацетона при рН 4-5 и оставляли в нем на 24 ч при -20 °С для полного осаждения белков. Ацетон удаляли после центрифугирования (13 тыс. об./мин, 15 мин) при температуре +4 °С. Полученный осадок суспендировали в буфере Лэммли (Laemmli, 1970), содержащем 0.125 М Трис-НСl, рН 6.8, 2 %-ный SDS, 0.1 М

ДТТ, 10 %-ный глицерин, 0.005 %-ный бромфеноловый синий, и прогревали в течение 7 мин при 100 °С.

2.10. SDS-электрофорез и иммуноблоттинг

Белки разделяли в 10 %-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS, pH 8.3 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Германия). Для определения молекулярного веса использовали белковые маркеры с молекулярной массой 10-170 кДа (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Литва) и переносили на мембрану PVDF (Millipore) по стандартной методике (Towbin et al., 1979).

Моноклональные антитела против белка теплового шока HSP 70 разводили в соотношении 1:1000; вторые антитела против IgG мыши (Sigma, США) разводили в соотношении 1:10000.

Для визуализации сигнала использовали систему хемилюминесценции ECL с добавлением субстратов люминола (1.25 мМ), паракумаровой кислоты (0.2 мМ) и 0.01 %-ной H₂O₂ в 1.5 М Трис-НСl pH 8.8. Хемилюминесценцию регистрировали на установке ChemiDok XRS (BioRad). Фотографии гелей были получены на приборе ChemiDoc XRS с помощью программы QuantityOne. Вычисление средних значений и 95 %-ных доверительных интервалов проводили при помощи программ Origin и Excel. В работе представлены данные трех и более независимых экспериментов.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Воздействие холода на гетерогенную популяцию кератиноцитов

Для того чтобы выяснить, оказывает ли холод различное действие на кератиноциты, находящиеся на разных стадиях дифференцировки, необходимо было, прежде всего, найти те оптимальные режимы охлаждения, при которых только часть исследуемой популяции клеток теряла жизнеспособность, а остальные сохраняли бы способность к пролиферации в культуре. С этой целью суспензию кератиноцитов, выделенных из фрагментов кожи, в концентрации 4×10^5 кл/мл подвергали действию следующих температур: -10, -20, -30, -40, -50, -60 и -70 °С в течение 1, 3, 5 и 10 мин.

Ввиду характерной особенности кератиноцитов базального слоя образовывать в культуре плотные агрегаты оказалось невозможным производить точный подсчет жизнеспособных клеток после охлаждения полученной суспензии. Предварительная диссоциация образовавшихся агрегатов с использованием ферментов приводит к потере способности клеток к пролиферации и образованию многослойного пласта,

свидетельствующего об их жизнеспособности. Поэтому сохранение жизнеспособности клеток в агрегатах оценивали по времени формирования ими многослойного пласта в процессе культивирования.

Приведенные в табл. 1 данные демонстрируют, что оптимальным режимом для селективного воздействия холода на исследуемые клетки оказалась экспозиция в течение 5 мин при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. В дальнейшей работе этот режим обработки низкими температурами служил отправной точкой при сравнении всех остальных вариантов проведенных экспериментов. Несмотря на гибель значительного числа клеток, жизнеспособными оставались преимущественно те из них, которые были способны к пролиферации и последующей дифференцировке, а именно, так называемые молодые кератиноциты.

Табл.1

Формирование многослойного пласта кератиноцитов после 5 мин охлаждения их в суспензии и в осадке (примечание: здесь и далее: «Н.О. – не образуется»)

Температура, $^{\circ}\text{C}$	Сроки образования многослойного пласта	
	В суспензии	В осадке
+37 (контроль)	20 — 25	20 — 25
-10	20 — 25	20 — 25
-20	20 — 25	20 — 25
-30	30 — 35	20 — 25
-40	40	30 — 35
-50	Н. О	30 — 35
-60	То же	40
-70	»	40

На рис. 1 представлены фотографии кератиноцитов, прикрепившихся к субстрату, в процессе их пролиферации и формирования многослойного пласта в контроле и после воздействия холодом. Можно видеть, что как в контроле (рис. 1-а), так и после воздействия холодом при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин (рис.1, б) через 7 суток после посева на фоне распластанных клеток видны многочисленные колонии круглых клеток. При охлаждении до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ наблюдается большее взаимодействие между клетками и выстраивание их в цепочки (рис.1, в). При этом за 7 суток многослойный пласт не образуется, крупные колонии отсутствуют, формируется большое число тяжей из цепочек клеток. При дальнейшем культивировании этих клеток, спустя 14 суток, образовавшаяся сетка заполняется новыми клетками, и образуются крупные скопления клеток, которые являются, по-видимому, основой для дальнейшего формирования многослойного пласта через 35–40 суток. (рис.1, г).

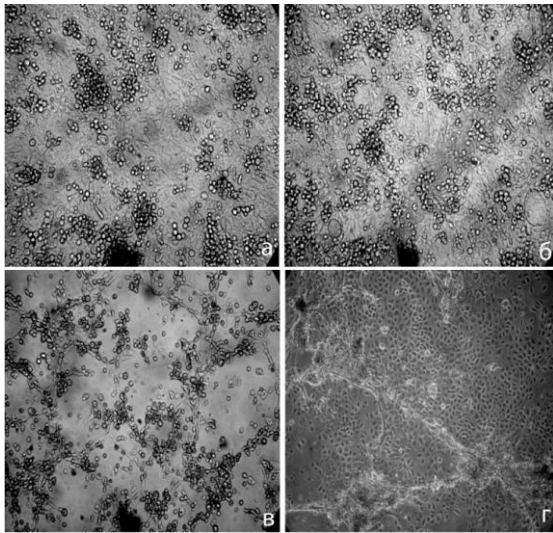


Рис. 1. Состояние кератиноцитов через 7 сут. культивирования после охлаждения их парами жидкого азота в суспензии: а - 37 °С (контроль), б - (-20 °С), в - (-40 °С); через 14 сут. культивирования - г - (-40 °С).

Так как кератиноциты в составе эпидермиса находятся в тесном взаимодействии друг с другом, необходимо было выяснить, в какой мере подобное взаимодействие может влиять на результат охлаждения. В связи с этим выделенные из ткани кератиноциты осаждали центрифугированием, и полученный осадок подвергали охлаждению парами жидкого азота в том же режиме, что и клетки в суспензии. Затем клетки суспендировали, вносили в чашки Петри и наблюдали за их способностью образовывать многослойный пласт.

Полученные результаты показали, что тесное взаимодействие между клетками действительно позволяет им выдерживать более низкие температуры. Эти клетки формировали пласт в течение 40 сут культивирования даже после охлаждения до -60 и -70 °С в течение 5 мин. При охлаждении осадка клеток до -40 или -50 °С пласт формировался уже за 30–35 сут. При меньших температурах охлаждения, равных -10 , -20 или -30 °С, реакция клеток не отличалась от контроля и пласт формировался за 20–25 сут (табл.1).

Для того чтобы проверить, обладают ли повышенной устойчивостью к действию низких температур кератиноциты, взаимодействующие между собой в составе ткани, охлаждали эпидермис, отделенный от дермы, и сравнивали время образования пласта выделенными из него кератиноцитами и кератиноцитами, охлажденными в виде суспензии. Как показано в табл. 2, и те и другие клетки образовывали многослойный пласт через 20–25 сут после охлаждения при -10 и -20 °С в течение 5 мин. Клетки, находившиеся в течение 5 мин при -30 °С, образовывали пласт за 30–35 сут, а после охлаждения до температуры ниже -40 °С (5 мин) были не в состоянии образовывать пласт даже в течение 40 сут.

Табл. 2.

Влияние охлаждения кератиноцитов в суспензии и в составе эпидермального слоя на время образования многослойного пласта.

Температура, °С	Сроки образования многослойного пласта	
	суспензии	Эпидермис
+37 (контроль)	20 — 25	20 — 25
-10	20 — 25	20 — 25
-20	20 — 25	20 — 25
-30	30 — 35	30 — 35
-40	40	40
-50	Н. О	Н. О
-60	То же	То же
-70	»	»

Таким образом, клетки базального слоя, охлажденные как в состоянии суспензии, так и в составе выделенного эпидермиса, не отличались по устойчивости к низким температурам. В связи с этим важно было выяснить степень влияния холода на кератиноциты, находящиеся в составе фрагментов цельной кожи. В этой серии экспериментов охлаждение выделенных биоптатов проводили двумя способами: в обычных чашках Петри и в чашках с перфорированными крышками. Во втором случае биоптаты подвергались непосредственному действию паров азота, подобно аналогичному воздействию на кожу человека в медицинских целях.

Уже в первых экспериментах обнаружилось, что клетки биоптатов кожи, взятых из различных участков кожного покрова, различаются по устойчивости к действию низких температур. Поэтому в дальнейшей работе было проведено сравнительное исследование влияния низких температур на жизнеспособность кератиноцитов, выделенных из трех различных по локализации в организме участков биоптатов кожи: веки, лицо и грудь. Для проверки способности исследуемых клеток формировать многослойный пласт использовали, как и в предыдущих случаях, разные температуры и разную экспозицию, но в табл. 3 приведены только окончательные результаты, характеризующие оптимальные режимы охлаждения, установленные для разных исследованных биоптатов.

Оказалось, что различная устойчивость кератиноцитов к низким температурам зависит как от локализации в кожной ткани, так и от условий обработки биоптатов холодом. Данные табл. 3 показывают, что клетки из области век менее устойчивы к холоду по сравнению с клетками лица и груди.

Табл. 3.

Оптимальные условия охлаждения биоптатов кожи разной локализации для формирования пласта кератиноцитами в течение 40 сут.

Примечание: Образование пласта контрольными клетками (37 °С) не зависело от локализации и составляло 20–25 сут.

Параметр	Чашки Петри			Чашки Петри перфорированные		
	веки	лицо	грудь	веки	лицо	грудь
Температура, °С	-30	-40	-50	-20	-40	-50
Время, мин	5	5	10	5	3	5

Более низкая устойчивость кератиноцитов из биоптатов кожи, подвергнутых охлаждению в перфорированной чашке, может объясняться деструктивным эффектом прямого воздействия паров жидкого азота на ткань.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при воздействии холодом на клетки или ткани в оптимальном режиме (5 мин при –40 °С) оставшиеся жизнеспособные клетки размножаются и образуют многослойный пласт практически во всех экспериментальных вариантах. Это давало основание полагать, что гибнут главным образом дифференцированные клетки.

Необходимо также учитывать, что клеточное взаимодействие играет существенную роль в устойчивости клеток к воздействиям низких температур, что объясняет устойчивость кератиноцитов, подвергавшихся охлаждению как в виде цельных фрагментов кожи, так и в виде осадка.

3.2. Иммунофлуоресцентный анализ гетерогенной популяции кератиноцитов

Для того, чтобы убедиться в справедливости высказанного предположения о большей устойчивости недифференцированных кератиноцитов, был проведен иммунофлуоресцентный анализ клеток, обработанных антителами против К19 (маркер стволовых клеток), К14 (маркер базальных или транзиторных клеток) и К10 (маркер дифференцированных кератиноцитов) после воздействия на них холодом и последующего перевода в культуру. Исходя из результатов предыдущих экспериментов, охлаждению в течение 5 мин при –20 и –40 °С подвергали не цельный биоптат, а только эпидермис, отделенный от дермы. Для выявления всех клеток, прикрепившихся и распластанных на субстрате, использовали окраску актинового цитоскелета родамин-фаллоидином.

Анализ состава гетерогенной популяции кератиноцитов в культуре проводили через 3 и 24 ч культивирования после воздействия холодом. Эти сроки выбраны потому, как было указано выше, что клетки разной степени дифференцировки в гетерогенной популяции базальных кератиноцитов отличаются по скорости адгезии к субстрату (Спичкина и др., 2006). Через 3 ч после посева прикрепляется только часть клеток, обладающих большим сродством к белкам базальной мембраны (в данном случае к коллагену), а через 24 ч адгезируют практически все клетки популяции.

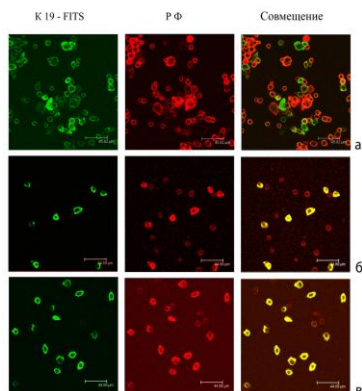


Рис. 2. Изменение соотношения стволовых и дифференцированных клеток в популяции кератиноцитов, прикрепившихся к субстрату за 3 ч после охлаждения до разных температур: а – 37 °С (контроль), б -- (-20 °С), в – (-40 °С). Здесь и на рис. 4 зеленые клетки, мечены антителами против кератина 19 (К19-ФИТЦ); красный – цитоскелет окрашенный родамин-фаллоидином (РФ) для визуализации всех клеток.

Анализ прикрепившихся клеток показал, что в контроле (37 °С) наряду с ярко окрашенными антителами против К19 стволовыми клетками присутствует также значительное количество дифференцированных кератиноцитов. Через 3 ч после воздействия холодом (при -20 °С) общее число прикрепленных клеток на препаратах снижалось. При этом относительное количество недифференцированных клеток возрастало. Дальнейшее понижение температуры до -40 °С сопровождалось отчетливым преобладанием на препаратах недифференцированных клеток. Подсчет соотношения стволовых и дифференцированных клеток показывает, что на долю стволовых клеток в контроле приходится 32 % от общего числа клеток, прикрепившихся к субстрату за 3 ч. После обработки холодом при температуре -20 °С их число увеличивается практически вдвое (до 63 %). После охлаждения до -40 °С их становится несколько больше (до 67 %), но эти различия не достоверны (рис.3, а). Таким образом, несмотря на снижение общего количества устойчивых клеток, быстро адгезирующих к субстрату, при понижении температуры до -40 °С соотношение между стволовыми и дифференцированными кератиноцитами остается практически тем же самым, что отражено на рис. 2 и рис. 3

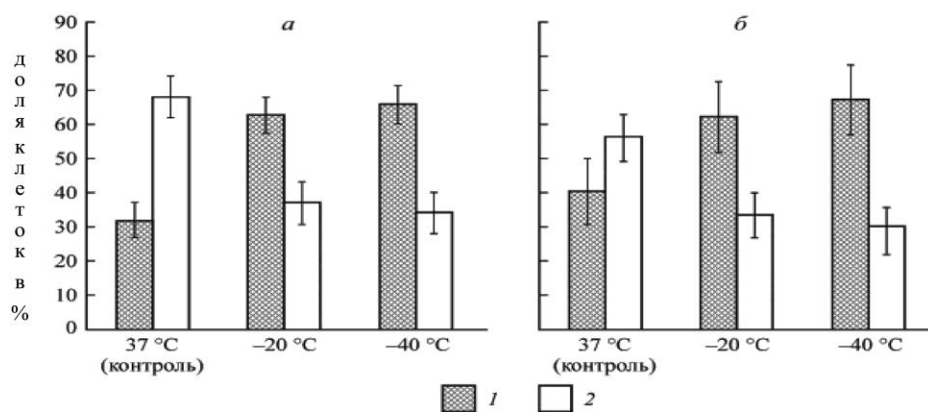


Рис. 3 Процентное соотношение жизнеспособных стволовых (1) и дифференцированных (2) кератиноцитов через 3 (а) и 24 (б) ч после охлаждения.

При анализе состава клеток, прикрепившихся к субстрату через 24 ч после охлаждения, как и следовало ожидать, на препаратах наблюдали увеличение общего количества клеток по сравнению с числом прикрепившихся в течение 3-х часов культивирования. При этом увеличение числа адгезировавших клеток, как в контроле, так и после действия холодом, происходило за счет стволовых кератиноцитов (рис. 4).

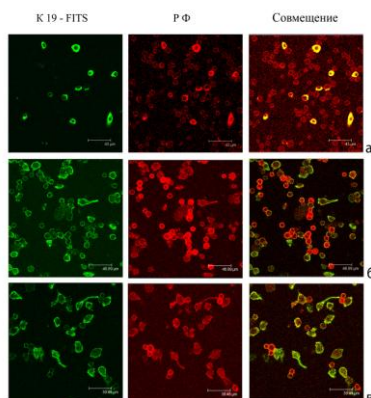


Рис. 4. Изменение соотношения стволовых и дифференцированных кератиноцитов, прикрепившихся через 24 ч культивирования после охлаждения. а – 37 °С (контроль), б -- (-20 °С), в – (-40 °С).

В контроле доля стволовых клеток в популяции составляла 42 %, после охлаждения при температуре -20 °С она возросла до 65 % и доходила до 70 % после -40 °С. Так же, как и в случае прикрепления клеток в течение 3 ч, наибольшее изменение состава клеток происходило за счет увеличения доли стволовых клеток в популяции почти в два раза уже под влиянием температуры -20 °С (рис. 3, б).

В наших предыдущих исследованиях было выявлено, что К19 не является маркером исключительно стволовых кератиноцитов, он содержится, но в меньших количествах, и в транзиторных клетках и постепенно исчезает в процессе перехода кератиноцитов в последующие дифференцированные состояния. В связи с этим клетки дополнительно метили антителами против К14, преимущественно взаимодействующими с транзиторными клетками,

и против K10, характерного маркера дифференцированных клеток. Такая метка должна была уточнить, в какой мере предыдущая окраска охлажденных клеток антителами против K19 соответствует именно доле стволовых кератиноцитов.

На приведенном рисунке (Рис. 5, а) видно, что доля транзиторных клеток в контроле через 3 ч после посева составляет 47 %. После обработки холодом при температурах -20 и -40 °C она увеличивается до 65 и 75 %, соответственно. Увеличение срока для прикрепления клеток до 24 ч приводит лишь к незначительным изменениям количества прикрепившихся клеток. В контроле за это время доля транзиторных клеток практически не изменяется (49 %). После охлаждения при температуре -20 °C она составляет те же 65 %, а при -40 °C их стало 68 % (рис. 5, б), что может являться результатом начавшегося процесса дифференцировки.

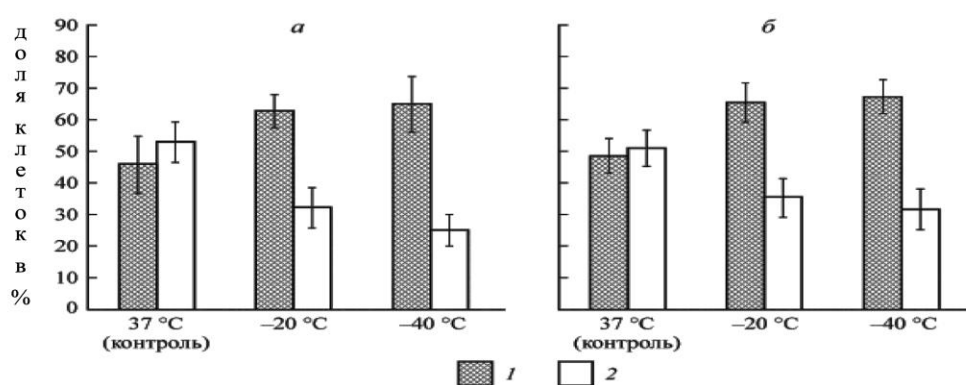


Рис. 5. Процентное соотношение транзиторных (1) и дифференцированных (2) кератиноцитов через 3 (а) и 24 (б) ч после охлаждения.

Таким образом, результаты проведенного анализа показывают, что в популяции клеток, оставшихся жизнеспособными после охлаждения при низких температурах, действительно преобладают молодые (стволовые и транзиторные) кератиноциты.

При оценке сроков формирования многослойного пласта кератиноцитов, подвергнутых охлаждению при разных температурах, подразумевалось, что увеличение времени формирования пласта при последовательном понижении действующих температур прямо связано с количеством погибших клеток в популяции. Вместе с тем, результаты иммунофлуоресцентного анализа соотношения недифференцированных (молодых) и дифференцированных (старых) клеток в популяции показывают, что наибольшие изменения в пользу преобладания недифференцированных клеток происходят уже после охлаждения до -20 °C, а дальнейшее понижение температуры до -40 °C существенно не изменяло состава популяции. Сопоставление этих данных приводит к заключению, что двукратное увеличение времени образования многослойного пласта в результате охлаждения до -40 °C связано, по-

видимому, с изменением физиологического состояния самих стволовых и транзиторных кератиноцитов, но не с дополнительной гибелью дифференцированных клеток. С участием, каких именно молекулярных механизмов обеспечивается устойчивость недифференцированных клеток к действию низких температур, пока не ясно.

В связи с тем, что устойчивость клеток может зависеть от уровня содержания белков теплового шока, был проведен электрофоретический анализ содержания белка HSP70 в лизатах контрольных и подвергнутых охлаждению клеток. Данные электрофоретического анализа показывают, что содержание белка теплового шока HSP70 в дифференцированных и недифференцированных кератиноцитах различается при воздействии на них низких температур, о чем свидетельствуют результаты, представленные на рис. 6. Можно видеть, что у дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов при 37 °С (контроль) HSP70 содержится в соизмеримых количествах в обоих вариантах, однако после воздействия низких температур при режиме -20 °С в течение 5 минут у недифференцированных клеток белок синтезируется в значительно большем количестве по сравнению с контролем. В то время, как у дифференцированных кератиноцитов, этот белок практически не синтезируется, у недифференцированных его исходное содержание значительно выше, и под воздействием охлаждения оно существенно возрастает. Это связано скорее всего с гибелью дифференцированных клеток, либо с нарушением их внутриклеточных процессов, в частности, нарушением синтеза белков, поскольку при 37 °С как у дифференцированных, так и у недифференцированных синтез белка теплового шока HSP70 осуществляется в соизмеримых количествах.

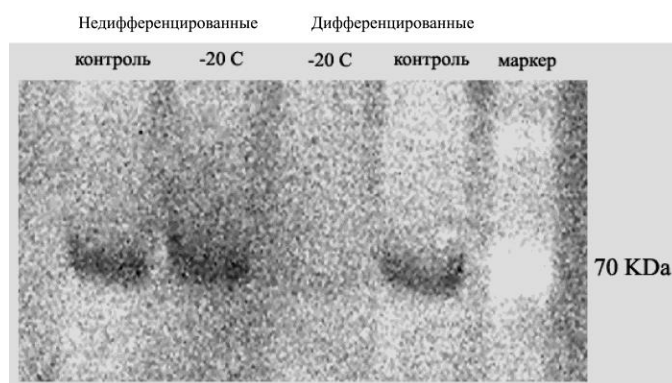


Рис. 6 Содержание белков теплового шока HSP70 в лизатах дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов до и после охлаждения при температуре -20 °С.

Однако, важно установить, являются ли обнаруженные различия в устойчивости к низким температурам у дифференцированных и недифференцированных кератиноцитов специфичными только для эпидермальных клеток, которые постоянно подвергаются

действию температурных изменений окружающей среды, или выявленная тенденция распространяется и на другие типы клеток. Проведенные эксперименты по воздействию низких температур на стволовые клетки костного мозга (СККМ) до и после их дифференцировки свидетельствуют о том, что они также имеют разную устойчивость к охлаждению в зависимости от степени их дифференцировки..

Результаты фотокolorиметрического анализа показали, что после охлаждения исходной суспензии СККМ до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ доля клеток, способных к дальнейшему росту в культуре, составляла около 70 %. При тех же условиях охлаждения суспензий СККМ, дифференцированных как в адипоцитарном, так и остеогенном направлении, доля жизнеспособных клеток снижалась до 50 % от общего числа клеток.

При понижении температуры до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ не было зафиксировано существенных различий по устойчивости к холоду между дифференцированными и недифференцированными СККМ. Доля клеток, способных к росту в культуре, во всех вариантах составляла 40 % от исходного количества.

Дальнейшее понижение температуры до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ приводило клетки к гибели. Клетки полностью утрачивали способность к распластыванию и пролиферации (рис. 7, а). При одном и том же режиме охлаждения СККМ, находящиеся в осадке, сохраняли большее количество клеток, как дифференцированных, так и недифференцированных, способных к росту в культуре, чем СККМ в состоянии суспензии. При охлаждении исходных СККМ в виде осадка до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ доля жизнеспособных клеток составляла примерно 90 %, а до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ около 70 % от общего количества клеток.

При дальнейшем снижении температуры до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ незначительная часть клеток в осадке (20 %) все-таки выдерживала охлаждение, в то время как клетки в суспензии полностью погибали.

При охлаждении до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ СККМ с адипогенной дифференцировкой жизнеспособными оставалось 70 % клеток, а при охлаждении до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ — около 50 %.. В то же время СККМ, дифференцированные в остеогенном направлении, при охлаждении в осадке были менее устойчивы к действию холода по сравнению с недифференцированными клетками. При воздействии на них температуры $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ доля жизнеспособных клеток составляла 60 %, а при охлаждении до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ жизнеспособными оставалось 40 % клеток (рис. 7, б). В то же время СККМ в осадке, дифференцированные в адипогенном и остеогенном направлениях, совсем не выдерживали охлаждения до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и погибали.

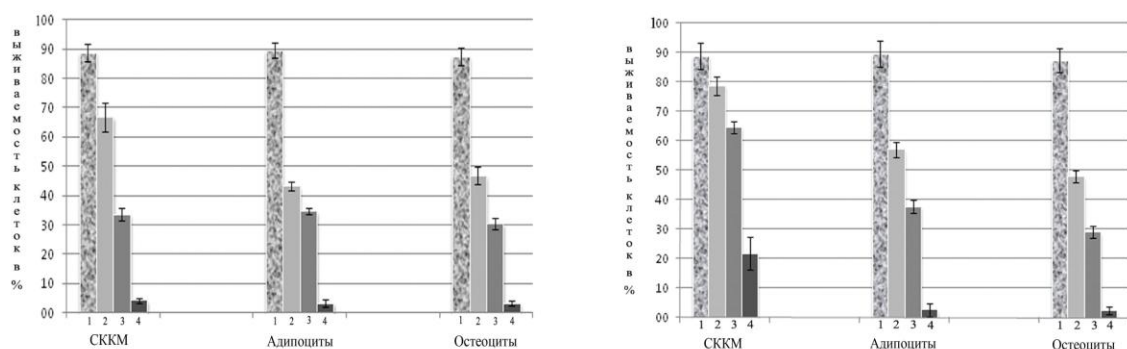


Рис. 7 . Степень выживаемости стволовых и дифференцированных СККМ после охлаждения их до низких температур. Клетки, охлажденные в виде: а) суспензия, б) осадка. Температура: 37 (1), –20(2), –40(3), –50(4) °С.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что устойчивость СККМ к воздействию низких температур снижается после их дифференцировки как в адипогенном, так и в остеогенном направлении.

Результаты настоящего исследования полностью согласуются с выше приведенными данными о повышенной устойчивости к действию холода стволовых и транзиторных кератиноцитов по сравнению с дифференцированными клетками. При этом, однако, степень устойчивости к действию низких температур у клеток этих двух типов различается.

Так, например, оптимальный режим охлаждения, при котором только часть исследуемой популяции клеток теряет жизнеспособность, для суспензии кератиноцитов составлял –40 °С в течение 5 мин, для суспензии СККМ он был –20 °С, 5 мин. Еще большие различия в устойчивости наблюдаются у клеток этих двух типов при охлаждении их не в суспензии, а в виде осадка. Так, кератиноциты в осадке выдерживали более низкие температуры (–70 °С, 5 мин), чем СККМ в таком же состоянии (–50 °С, 5 мин). Эти различия в степени устойчивости вполне понятны, так как разные клетки в зависимости от типа ткани и от их локализации в организме по-разному подвергаются воздействию изменений температуры окружающей среды и поэтому в разной степени адаптированы к низким температурам.

Многие исследователи, изучающие стволовые и опухолевые клетки, утверждают, что сходство между этими клетками заключается в способности к самообновлению и активной пролиферации. В то же время было показано, что опухолевые клетки способны к превращению в нормальные клетки, механизм которого идентичен процессу дифференцировки нормальных стволовых клеток (Shackleton, 2010). В связи с этим было проведено исследование устойчивости клеток эпидермоидной карциномы человека линии А 431.

Результаты, полученные в наших опытах, позволяют заключить, что после 5-минутного охлаждения клеток постоянной линии А431 в суспензии самая низкая температура, которую они выдерживали, была равна $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, при этом часть популяции (20 %) сохраняла жизнеспособность. Клетки при температурах ниже $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ полностью погибали. В то же время клетки, подвергавшиеся охлаждению при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ практически не отличались от клеток в контроле ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Как можно видеть из результатов, приведенных на рис. 8, доля клеток, оставшихся жизнеспособными после воздействия при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, снижалась вдвое. В то же время при охлаждении клеток в осадке их устойчивость к низким температурам не так резко падала по сравнению с тем, что наблюдалось при охлаждении их в суспензии. В результате охлаждения при -10 и $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ клетки не отличались сильно от контроля, при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ около 60 % клеток оставались жизнеспособными, при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ доля оставшихся жизнеспособными клеток составляла 40 %. Устойчивость клеток к воздействию низких температур резко падала при температуре ниже $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, причем клетки полностью разрушались.

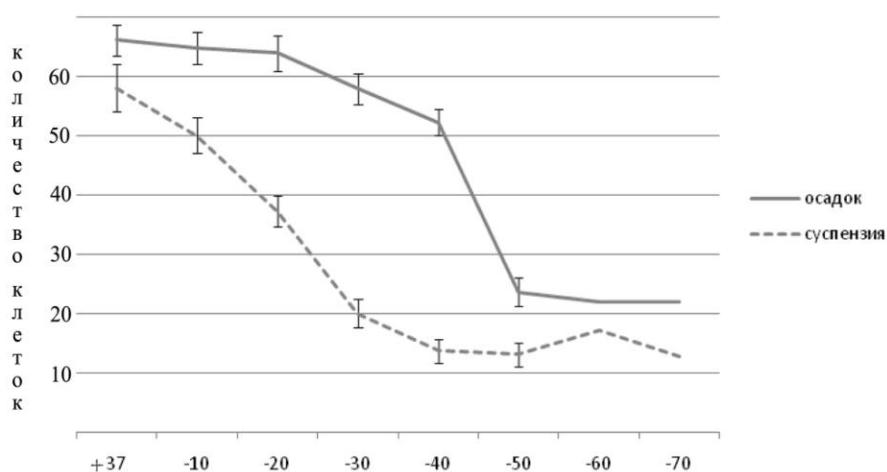


Рис. 8 Устойчивость к действию низких температур клеток А431 в осадке и в суспензии. Здесь и на рис. 9 по оси ординат количество клеток $\times 10^3$

Вопреки нашим ожиданиям клетки линии А431 оказались менее устойчивыми к воздействию низких температур, чем СККМ. Предельной температурой, которую они выдерживали при охлаждении в виде суспензии, была $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, что на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ отличалось от СККМ, которые выдерживали $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Такая же тенденция наблюдалась и при охлаждении их в виде осадка, они выдерживали более низкие температуры, чем при охлаждении в виде суспензии до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом, однако, они были менее устойчивыми, чем СККМ, которые выдерживали $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ за такое же время экспозиции.

Возможно, что причиной их меньшей устойчивости к низким температурам по сравнению с СККМ было их превращение из опухолевых клеток в постоянную клеточную линию в процессе культивирования. Чтобы оценить вышеуказанное предположение, был проведен анализ устойчивости к действию низких температур свежевыделенных опухолевых клеток EHS саркомы из мышей. Оказалось, что самая низкая температура, при которой после 5-минутного воздействия часть клеток (60 %) сохраняла жизнеспособность, равнялась $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Устойчивость этих клеток при более низких температурах резко снижалась: так, при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ все клетки разрушались и теряли жизнеспособность. В то же время при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ количество распластанных клеток практически не отличалось от контроля и составляло около 95 %. При дальнейшем понижении температуры до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ доля распластанных клеток составляла 80 %.

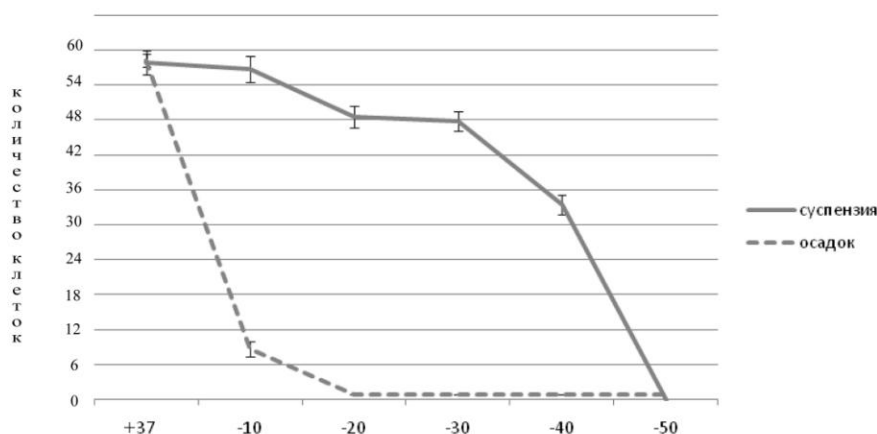


Рис. 9 Устойчивость клеток EHS к воздействию низких температур в состоянии осадка и в суспензии.

Полученные результаты по охлаждению свежевыделенных опухолевых клеток EHS из мышей в виде суспензии подтвердили наше предположение: они оказались более устойчивыми, чем клетки постоянной линии A431, полученной из опухолевых клеток. Однако при охлаждении в виде осадка они теряли способность к распластыванию даже при охлаждении до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Причину этого явления еще предстоит выяснить в дальнейших исследованиях. Кроме того, результаты охлаждения EHS в виде суспензии также указывают на то, что устойчивость этих клеток похожа на устойчивость СККМ, охлажденных в виде суспензии. Оба типа клеток теряют жизнеспособность в течение 5 мин при температуре $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

После обработки температурой, равной $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, количество распластанных клеток у СККМ составляло 40 %, у EHS 60 %, а при охлаждении до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ у СККМ оно равнялось 70 %, в то время у EHS - 80%. Эти данные доказывают, что устойчивость стромальных клеток к

воздействию низких температур действительно очень похожа на устойчивость свежевыделенных опухолевых клеток саркомы. Кроме того, показано, что получение из опухолевых клеток постоянной клеточной линии может приводить к снижению их устойчивости к низким температурам по сравнению с исходными клетками.

Таким образом, совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что клетки разного типа различаются по устойчивости к низким температурам и что недифференцированные и опухолевые клетки являются более устойчивыми к холоду, чем дифференцированные при наличии межклеточных взаимодействий. Выявленные различия в устойчивости клеток к холодovому воздействию могут иметь практическое применение для обогащения недифференцированными клетками гетерогенных клеточных популяций, используемых в клеточных технологиях.

Выводы

1. Базальные кератиноциты кожи человека обладают различной устойчивостью к действию низких температур в зависимости от степени дифференцировки, локализации в разных участках кожного покрова, а также от способа воздействия на них парами жидкого азота.
2. Наибольшую устойчивость в гетерогенной популяции кератиноцитов демонстрируют недифференцированные клетки, находящиеся в осадке или в составе фрагментов ткани, которые сохраняют способность к размножению и последующей дифференцировке, в то время, как уже дифференцированные клетки погибают в процессе воздействия низкими температурами.
3. Аналогичной повышенной устойчивостью к действию охлаждения обладают стромальные клетки костного мозга крысы, устойчивость которых снижается после их направленной дифференцировки в адипоцитарном или остеогенном направлении.
4. Свежевыделенные опухолевые клетки EHS саркомы обладают повышенной устойчивостью к действию низких температур, соизмеримой в равных условиях с уровнем устойчивости стволовых клеток костного мозга. Наряду с этим клетки эпидермоидной карциномы, переведенные в культуру и существующие в виде постоянной клеточной линии A431, имели существенно меньшую устойчивость.
5. Одной из возможных причин повышенной устойчивости недифференцированных кератиноцитов может быть обнаруженное в них значительное увеличение синтеза белка теплового шока HSP70 после воздействия холодом, по сравнению с дифференцированными клетками, в которых он практически не синтезируется.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Райдан М.**., Шубин Н.А, Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. 2011. Влияние охлаждения до низких температур на жизнеспособность кератиноцитов кожи человека, находящих ся на разных стадиях дифференцировки. Цитология. 53(1): 22–30.
2. **Райдан М.**., Шубин Н.А, Николаенко Н.С., Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. 2011. Устойчивость к действию низких температур стромальных клеток костного мозга при их дифференцировке. Цитология. 53(3): 221–226.
3. **Райдан М.**., Шубин Н.А, Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. Устойчивость кератиноцитов к низким температурам в условиях *in vitro*. Материалы Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». 25-28 октября 2010 г. МГУ, Москва. С. 60.
4. **Райдан М.**., Шубин Н.А., Кропачева И.В, Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. Устойчивость кератиноцитов и клеток линии А431 к низким температурам”. Материалы IV ежегодной научно-практической конференции с международным участием "Новое в практической криомедицине» 9 ноября 2010 г. Москва. С. 77.
5. **Райдан М.**., Шубин Н.А, Блинова М.И., Прохоров Г.Г., Пинаев Г.П. Воздействие низких температур на клетки кожи человека *in vitro*. Материалы 15-го Всемирного конгресса Международного общества криохирургии. 1-4 октября, 2009, г. Санкт Петербург. С. 115.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурхунова Е.Н.* 2004. Особенности репаративной регенерации тканей после криодеструкции. СВЧ-криодеструкции и СВЧ деструкции. Автореф. докт. дис. М. 44с.
- Румянцева Е.Е., Гладько В.В., Шавронов В.В., Таганов А.В., Калмыкова З.В.* 2005. Исследование качества жизни пациентов с базально-клеточным раком кожи до, во время и после аппаративной криодеструкции. Клиническая дерматология и венерология.1 : 50—53
- Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Воронкина И.В., Кухарева Л.В., Блинова М.И., Пинаев Г.П.* 2006. Выделение популяции базальных кератиноцитов человека путем их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса. Цитология. 48(10): 841–845.
- Сандомирский Б. П.* 1987. Патологические механизмы действия низких температур на ткани. Практическая криомедицина. Здоровье. 246 (8-23).
- Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Таганов А. В., Короткий Н. Г., Виссарионов В. А., Стенько А.Г.* 2009. Келлоидные рубцы. Этиология, клиническая, морфологическая, физикальная диагностика и лечение СВЧ-криогенным методом: Руководство для врачей. М: РАЕН. 192с.

Юдинцева Н. М., Горелик Ю. В., Дьяконов И. А., Калмыкова, Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 1999. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны. Цитология. 41 (3/4): 328.

Alegna R., Paola T., Guillermo A., Mirian Strauss. 2005. Is hypothermia a stress condition in HepG2 cells? Expression and localization of Hsp 70 in human hepatoma cell line. Tissue and cell. 37: 59–65.

Batycky R. P., Hanmerstedt R., Edwards D. A. 1997. Osmotically driven intracellular transport phenomena. Phill. Trans. R. Soc. Lond. 355: 2459–2488.

Bischof J., He X. 2005. Physical aspects of cryobiology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1066: 1–22.

Breton G., Danyluk J., Quellet F., Sarhan F. 2000. Over expression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. Annu. Rev. 6: 57–99.

Byrant G., Wolfe J. 1989. The interaction and fusion of bilayers formed from unsaturated lipids. Eur. Biophys. 16: 369–374.

Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251: 6062–6067.

Egbert, J.E. Schwartz G.S., Walsh A.W. 1996. Diagnosis and treatment of an ophthalmic artery occlusion during an intralesional injection of corticosteroid into an eyelid capillary hemangioma. Am J Ophthalmol. 121(6).-p. 638-642.

Guenther J. F., Seki S., Kleinhans F. W., Edashige K., Roberts D. M., Mazur P. 2006. Extra- and intra-cellular ice formation in Stage I and II *Xenopus laevis* oocytes. Cryobiology. 52: 401–416.

Granov A. M., Prokhorov D. G., Andreev A. P., Pinaev G. P., Prokhorov G. G., Vlasova A. V. 2001. Temperature measuring and evaluation of tumor cell viability in different zones of an ice ball. Practical application of in vitro experimental results. Basics of cryosurgery. 3: 15–24.

Kibbey M.C. 1994. Maintenance of the EHS sarcoma and matrigel preparation. J. Tissue Culture Methods. 16: 227–230.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680–685.

Mc Grath J. J., Cravalho E. G. 1974. HeLa cell freezing injury: intracellular ice formation injury and survival as function of cooling velocity. Cryobiology. 11: 549–556.

Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 14: 251–272.

Mazur P., Kleinhans F. W. 2008. Relationship between intracellular ice formation in oocytes of the mouse and *Xenopus* and the physical state of the external medium—a revisit. Cryobiology. 56: 22–27.

Peter K., Jensen A., Bolund L. 1988. Tissue culture of human epidermal keratinocytes: a differentiating model system for gene testing and somatic gene therapy. *Journal of Investigative Dermatology* 103, 391–394

Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 98: 2615-2625.

Rheinwald J.G. 1980. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes. *Meth.Cell Biol.* 21A: 229-254.

Shackleton M. 2010. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol.* 20(2):85-92

Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. 2005. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfusion. Med. Rev.* 19: 127–142.

Teryman H. T. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu. Rev. Biophys. Biochem.* 3: 341–363.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*76: 4350-4.

Wolfe J. 2002. Cellular thermodynamics. *Encyclopedia of Life Science.* A1363: 1–15.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам Отдела клеточных культур Института цитологии РАН за помощь в работе. Особенно автор благодарен своему научному руководителю проф. Г.П. Пинаеву, М.И. Блиновой, Н.С. Николаенко, Н.А. Шубину, Н. В. Кропачевой, Н. М. Юдинцевой, Л.В. Туровой, а также проф. Г.Г. Прохорову - ведущему научному сотруднику ФГУ НИИ Онкологии им. Н.Н. Петрова Минздравсоцразвития РФ и врачу Т.В. Колесниковой.