

ДИСКУССИОННЫЕ И ОБЩЕТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

Жизнь без воды: криптобиоз беспозвоночных как модель для разработки технологии консервации биоматериала нового поколения

Е.И. Шагимарданова, М.Р. Шарипова, А.А. Ризванов, И.С. Захаров, О.А. Гусев
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Life without water: cryptobiosis of invertebrates as a model for next generation technology of biomaterials preservation

E.I. Shagimardanova, M.R. Sharipova, A.A. Rizvanov, I.S. Zaharov, O.A. Gusev
Kazan (Volga region) federal university, Kazan

Достижения в области клеточной трансплантологии, геной и тканевой инженерии делают биологический материал различного происхождения важным терапевтическим инструментом в клинической практике. Сохранение жизнеспособности клеток в настоящее время достигается их замораживанием при -80°C или в жидком азоте. Технология криозаморозки является дорогостоящей и имеет значительные ограничения при транспортировке биоматериала. Альтернативой криотехнологии может служить сохранение биологического материала в обезвоженном состоянии при комнатной температуре. Существует ряд организмов, способных выживать при полной потере воды. Знание механизмов, лежащих в основе толерантности к обезвоживанию, позволит разработать технологии хранения молекул, клеток и органов млекопитающих в обезвоженном состоянии для их дальнейшего использования в медицине, фармакологии и биотехнологии.

Ключевые слова: криптобиоз, культуры клеток, обезвоживание.

Сохранение живых клеток, тканей и органов в течение длительного времени является необходимым для их клинического использования. Технологии криозаморозки, которые широко используются в настоящее время, имеют ряд недостатков и ограничений, в связи с чем возникла необходимость разработки более эффективных методов сохранения биоматериала — биомолекул, клеток, тканей и органов — на протяжении длительного времени.

В зависимости от типа клеток (прокариотические/эукариотические, ядерные/безъядерные) для поддержания жизнеспособности культур используют различные методы: от периодического пересева на свежую среду до лиофилизации и криозаморозки [1]. Каждый метод имеет ряд недостатков, главными из которых являются: 1) потребность в дорогостоящем оборудовании для поддержания низкой температуры, особенно при транспортировке; 2) повреждение биоматериала при замораживании-оттаивании; 3) трудоемкость; 4) угроза контаминации. Альтернативой существующим методам может служить хранение биологического материала в обезвоженном виде при комнатной температуре.

e-mail: rizvanov@gmail.com

To date, advances in the field of tissue engineering, cell transplantation and genetic engineering have made the biological materials of different origin an important therapeutic tool in clinical medicine. Currently, cells preservation is achieved by freezing at -80°C or in liquid nitrogen. Cryopreservation technology is expensive and has considerable limits during transportation. Preservation of viable biological material in dry state under ambient temperature is considered as attractive, but yet fully achieved alternative. There are organisms which are able to survive complete water loss. Understanding of mechanisms underlying dehydration tolerance will allow the development of dry preservation technology for molecules, cells and organs, and further use of these methods in medicine, pharmacology and biotechnology.

Key words: cryptobiosis, cell culture, dehydration.

Использование сахаров при консервации биоматериалов

Первые попытки разработать технологию высушивания биоматериала были связаны с использованием трегалозы и других сахаров для сохранения жизнеспособности клеток. Были получены некоторые многообещающие результаты. Так, лиофильно-высушенные в присутствии трегалозы мышинные сперматозоиды были успешно использованы для искусственного оплодотворения и получения жизнеспособного потомства [2]. Использование трегалозы стабилизировало ДНК в соматических клетках овцы при их высушивании: при переносе генетического материала из клеток, хранившихся 3 года при комнатной температуре, в безъядерные ооциты формировались нормальные бластоциты [3]. Однако в обоих случаях клетки, используемые в качестве доноров генетического материала, были нежизнеспособными. С другой стороны, лиофилизированные в присутствии трегалозы безъядерные клетки (эритроциты и тромбоциты) восстанавливали метаболическую активность после регидратации [4, 5]. Другие исследователи получили противоречивые данные об

отсутствии эффекта добавления трегалозы на степень выживаемости клеток мышей при их лиофилизации [6]. Внутриклеточная трегалоза увеличивала осмоотолерантность, но не толерантность к высушиванию [7]. Были получены данные, что для увеличения степени жизнеспособности клеток необходимо присутствие трегалозы на обеих сторонах клеточной мембраны [8–10]. Поскольку клетки млекопитающих непроницаемы для трегалозы, разработано несколько подходов для эффективного введения сахара внутрь клеток, включая трансфекцию [11], экспрессию транспортеров [12], введение пор [8], активацию нативных транспортных каналов [10, 13], микроинъекции [14], эндоцитоз [15, 16]. Отметим, что использование трегалозы в большинстве работ являлось попыткой оптимизации процедуры лиофилизации (что подразумевает заморозку образца и последующее высушивание в вакууме), а не создания новой технологии консервации. Последнее подразумевает временную приостановку метаболизма и иммобилизацию структур клеток. При этом при регидратации свойства и функции биомолекул в клетках должны быть полностью восстановлены.

Криптобиоз

Периоды отсутствия активности и подавления метаболизма является широко распространенным явлением как у растений, так и у животных. Состояние организма, при котором метаболизм практически не регистрируется — криптобиоз — связан с физическим состоянием воды в клетке. Различают ангидробиоз — полную потерю воды (остаток воды в организме менее 5%), осмобиоз — торможение метаболизма, вызванное осмотическим стрессом и криобиоз — замерзание. Исключение составляет аноксибиоз — замедление метаболизма в результате отсутствия воздуха, которое происходит в условиях нормального состояния воды в клетке. Появление и эволюция криптобиоза происходила независимо несколько раз внутри царства бактерий и одноклеточных, а также многоклеточных растений (мхи, лишайники, печеночники, высшие растения) и животных (нематоды, коловратки, тихоходки, ракообразные и насекомые) [17–19].

Хорошо изученной формой криптобиоза является ангидробиоз — ответ на потерю воды в клетках. Способность к индукции ангидробиоза присуща организмам разного уровня сложности: споры бактерий и грибов, семена и вегетативные органы некоторых растений (плаунки), яйца турбеллярий, нематоды, коловратки, тихоходки, ногохвостки, цисты примитивных ракообразных, включая артемий, личинки хирономиды [20]. Некоторые организмы индуцируют криптобиоз на определенной стадии эмбрионального или постэмбрионального развития (эпифии и покоящиеся яйца некоторых ракообразных), другие на любом этапе жизненного цикла (тихоходки, коловратки), третьи — на определенной стадии развития (личинки хирономиды). Общим свойством этих организмов является их малый размер (менее 1 мм), особенно в состоянии криптобиоза. Самый крупным криптобиотическим насекомым, культивируемым в лабораторных условиях, является личинка хирономиды *Polipedium vanderplanki* — ее размеры достигают 7–8 мм в длину.

Разработка метода культивирования хирономид в лабораторных условиях позволила установить

основные закономерности ангидробиоза на клеточном и молекулярном уровнях [22]. Изучение всех механизмов, лежащих в основе криптобиоза у животных, является ключевым фактором разработки эффективной технологии презервации чувствительных к обезвоживанию клеток. Рассмотрим основные компоненты роль которых в индукции и поддержании криптобиоза, установлена.

Механизмы криптобиоза

Большинство организмов, способных к ангидробиозу, накапливают большое количество трегалозы во время дегидратации — около 10–20% сухой массы тела [20–23]. Трегалоза замещает связанную и свободную воду в клетках, способствуя «застекловыванию» и поддержанию структуры клеточных мембран и белков. Важным свойством трегалозы является высокая растворимость, низкая реакционная способность и низкая тенденция к кристаллизации. Среди сахаров и высокомолекулярных спиртов трегалоза может обеспечить эффективную защиту при обезвоживании из-за способности замещать воду и формировать стеклоподобную структуру. Таким образом, сахар заполняет пространство в клетке и позволяет упаковать клеточные компоненты, предотвращая их повреждение и агрегацию биологических молекул. Считается, что трегалоза стабилизирует биологические мембраны и липосомы. Мембраны, высушенные в присутствии трегалозы в концентрации, присущей животным-ангидробионтам, не подвергались морфологическим повреждениям, включая слияние везикул во время высыхания [20]. Таким образом, трегалоза является самой эффективной молекулой для сохранения мембран при высушивании, поскольку действует как протектант при более низких концентрациях, чем другие дисахариды. Трегалоза также стабилизирует лабильные белки во время дегидратации [24]. При этом трегалоза взаимодействует с сухими белками, посредством образования водородных связей между гидроксильной группой сахара и полярным остатком белка. Кроме того, трегалоза может эффективно ингибировать окисление белков и ненасыщенных жирных кислот в состоянии обезвоживания [25]. Таким образом, трегалоза может выполнять протекторную роль в стабилизации белков и мембран и поддержании долговременного ангидробиоза в клетках.

Белки теплового шока (HSP) действуют как молекулярные шапероны в регуляции клеточного гомеостаза и формировании устойчивости к стрессам. Известно, что HSP-белки аккумулируются в клетках семян растений в ответ на высыхание [26]. Показано, что в личинках *P. vanderplanki* шапероны *hsp90*, *hsp70*, *hsc70*, *hsp60*, а также малые HSP (*hsp20* и *hsp23*) экспрессируются во время инициации ангидробиоза и выхода из него [27]. Индукция экспрессии *hsp26* в цистах артемий и *hsp70* у тихоходок обнаружена во время высыхания [28, 29]. Также имеются данные об отсутствии или уменьшении экспрессии HSP во время высыхания [30]. Возможно синергическое действие HSP и других макромолекул для обеспечения успешного ангидробиоза и, кроме того, экспрессия HSP может быть видоспецифична.

Длительное время считалось, что Lea-белки (Late embryogenesis abundant) характерны только для растений. Они продуцируются в большом количестве

(до 4% общего белка) во время развития семян, участвуют в приобретении устойчивости к обезвоживанию в семенах, пыльце и у плаунковых, толерантности к другим видам стрессов [31]. В 2002 г. белок, относящийся к семейству Lea, был обнаружен у нематоды [32], позже появились доказательства присутствия этих белков у других видов животных [33]. Считается, что Lea-белки действуют как молекулярные шапероны: их суперскрученная структура формирует спирали и филаменты, ассоциированные с цитоскелетом, усиливая механическую силу клеток [34]. Показано, что эти белки предотвращают необратимую агрегацию других белков при обезвоживании *in vitro*, действуя как молекулярный щит [35]. В личинках *P. vanderplanki* многие Lea-белки экспрессируются во время индукции криптобиоза: транскрипты, соответствующие Lea-белкам составляют 12% общих генов, экспрессирующихся после 12 ч обезвоживания [36]. Показано, что Lea-белки формируют стекловидное вещество, стабилизируя трегалозный стекловидный матрикс. Потенциальные Lea-белки обнаружены также у криптобиотических тихоходок [37].

Во время обезвоживания продуцируется большое количество активных форм кислорода, которые служат источником окислительного стресса. Анализ EST баз данных показал, что во время криптобиоза *P. vanderplanki* экспрессируется большое количество генов, связанных с окислительным стрессом [38]. В частности, идентифицированы каталаза, глутатион пероксидаза и несколько супероксиддисмутаз, экспрессия которых усиливалась во время обезвоживания [36, 38]. Вероятно, это происходит вследствие увеличения концентрации АФК при обезвоживании. Накопление антиоксидантов, активность которых сохраняется в обезвоженной личинке, может быть одним из ключевых факторов, обеспечивающих выживание организмов при высыхании. Это согласуется с данными, полученными при исследовании цианобактерий, нематод, семян и клеток растений, способных к криптобиозу [39, 40]. Продукция антиоксидантов играет ведущую роль в минимизации окислительных повреждений биомолекул для успешного протекания криптобиоза.

Стресс, который испытывают клетки при обезвоживании, служит причиной повреждений ДНК, которые элиминируются после регидратации [38]. Было продемонстрировано, что ряд генов, в частности *rad23* и *rad51*, отвечающих за репарацию ДНК, экспрессируются при переходе в состояние криптобиоза и при регидратации. Механизм репарации неясен. Считают, что происходит восстановление фрагментированной ДНК системой репарации клеток, либо поврежденные клетки элиминируются по пути апоптоза, позволяя интактным клеткам пролиферировать. Теория наличия высокоактивной системы репарации у животных ангидробионтов высказывалась несколькими исследователями [20, 41, 42]. Обычно репарация ДНК происходит менее чем за 24 ч, либо индуцируется процесс апоптоза или некроза [43]. У личинок хирономиды полная репарация ДНК занимает более 48 ч, при этом не происходит индукции апоптоза. Механизм репрессии апоптоза у личинок не известен. Возможно регуляция апоптоза и индукция репарации ДНК после регидратации являются важными факторами криптобиоза.

Перспективы

Установленные механизмы криптобиоза позволяют разработать эффективную методику сохранения клеток и тканей млекопитающих. Большинство работ в этой области связаны с использованием трегалозы в качестве биопротектанта. Становится очевидным, что одной трегалозы не достаточно для сохранения жизнеспособности биоматериала при высушивании. Показано, что использование трегалозы совместно с галлатом эпигаллокатехина — полифенолом, выделенным из зеленого чая, обладающим антиоксидантным действием, значительно увеличивало жизнеспособность клеток крови человека при их лиофилизации. Авторы предположили, что это связано со способностью антиоксиданта стабилизировать мембраны при лиофилизации и его синергическим действием с трегалозой [44]. Добавление в среду трегалозы совместно с каталазой оказывало положительное действие на жизнеспособность, восстановление клеток костного мозга мыши после заморозки. Их действие благоприятно сказывалось на миграции и прикреплении клеток крови человека [45]. Авторы объясняют этот эффект предотвращением клеточной гибели в результате индукции апоптоза. Добавление трегалозы и каталазы в среду для криозаморозки клеток крови человека приводило к увеличению сохранности клеток и способствовало их миграции и адгезии [46]. Экспрессия стрессового белка р26 из артемии увеличивала выживаемость эмбриональных клеток почек человека после высушивания и последующей регидратации в присутствии трегалозы [47]. Пептид, полученный на основе последовательности Lea-белка из хирономиды *P. vanderplanki*, способствовал предотвращению агрегации лизосом вследствие потери воды. Более того, пептид оказывал подобное действие при высушивании белка α -казеина [48].

Показано, что клетки жирового тела хирономиды *P. vanderplanki* выживают при полном высыхании даже при удалении центральной нервной системы, указывая на то, что каждая клетка автономно контролирует запуск программы ангидробиоза [49]. Это позволит получить культуры клеток ангидробиотического насекомого, что может обеспечить успех при разработке технологии сохранения клеток в высушенном состоянии. Так, японские ученые впервые получили клеточные линии из ангидробиотического насекомого *P. vanderplanki*. Клетки сохраняли жизнеспособность при почти полном высыхании, хотя и с низкой частотой, и были неспособны пролиферировать после регидратации [50]. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что перспективным путем повышения устойчивости клеток высушенных эукариот к обезвоживанию будет комплексное внедрение в них трегалозы, LEA-белков и антиоксидантов, имитируя естественные процессы, происходящие в криптобиотической хирономиде.

Заключение

Изучение организмов, способных к индукции ангидробиоза, позволило установить основные механизмы, обеспечивающие их выживание при обезвоживании. Эти исследования открывают значительные перспективы в биотехнологии и способствуют становлению нового направления — криптобиотической инженерии, связанной с развитием методов сохранения биологического материала, который

является чувствительным к обезвоживанию. Важной биотехнологической задачей является подбор сред, включающих все необходимые компоненты для поддержания криптобиоза. Кроме того, необходимым условием является разработка оптимального метода высушивания, который не приводит к повреждению клеточных мембран, белков и нуклеиновых кислот. Исследования в этой области приведут к развитию технологий безводного хранения клеток, тканей и органов млекопитающих при комнатной температуре, и будут инновационным прорывом в области клеточной инженерии, трансплантации тканей и органов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Julca I., Alaminos M., González-López J. et al. Xeroprotectants for the stabilization of biomaterials. *Biotechnol. Adv.* 2012; in press.
2. Wakayama T., Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16(7): 639–41.
3. Loi P., Matzukawa K., Ptak G. et al. Nuclear transfer of freeze-dried somatic cells into enucleated sheep oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 2008; 43: 417–22.
4. Quan G.B., Han Y., Liu M.X. et al. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. *Cryobiology* 2011; 62(2): 135–44.
5. Zhou X.L., Zhu H., Zhang S.Z. et al. Freeze-drying of human platelets: influence of intracellular trehalose and extracellular protectants. *Cryo. Letters.* 2006; 27: 43–50.
6. Ono T., Mizutani E., Li C. et al. Nuclear transfer preserves the nuclear genome of freeze-dried mouse cells. *J. Reprod. Dev.* 2008; 54(6): 486–91.
7. García de Castro A., Tunnacliffe A. Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. *FEBS Lett.* 2000; 487(2): 199–202.
8. Eroglu A., Russo M.J., Bieganski R et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18(2): 163–7.
9. Lynch A.L., Slater N.K. Influence of intracellular trehalose concentration and pre-freeze cell volume on the cryosurvival of rapidly frozen human erythrocytes. *Cryobiology* 2011; 63(1): 26–31.
10. Buchanan S.S., Pyatt D.W., Carpenter J.F. Preservation of differentiation and clonogenic potential of human hematopoietic stem and progenitor cells during lyophilization and ambient storage. *PLoS One* 2010; 5(9): 12518.
11. Guo N., Puhlev I., Brown D.R. et al. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18(2): 168–71.
12. Chakraborty N., Menze M.A., Elmoazzen H. et al. Trehalose transporter from African chironomid larvae improves desiccation tolerance of Chinese hamster ovary cells. *Cryobiology* 2012; 64(2): 91–6.
13. Elliott G.D., Liu X.H., Cusick J.L. et al. Trehalose uptake through P2X7 purinergic channels provides dehydration protection. *Cryobiology* 2006; 52(1): 114–27.
14. Eroglu A., Lawitts J.A., Toner M. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology* 2003; 46(2): 121–34.
15. Hubel A., Darr T.B. Passive loading of trehalose into cells. *Cryobiology* 2000; 45: 227.
16. Chakraborty N., Biswas D., Parker W. et al. A role for microwave processing in the dry preservation of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2008; 100(4): 782–96.
17. Clegg J.S. Cryptobiosis — a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2001; 128: 613–24.
18. Rebecchini L., Altiero T., Guidetti R. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invert. Surv. J.* 2007; 4: 65–81.
19. Nelson D.R. Current status of the tardigrada: evolution and ecology. *Integr. Comp. Biol.* 2002; 42: 652–59.
20. Watanabe M. Anhydrobiosis in invertebrates. *Appl. Entom. Zool.* 2006; 41: 15–31.
21. Watanabe M., Kikawada T., Minagawa N. et al. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. 2002. *J. Exp. Biol.* 205: 2799–802.
22. Cornette R., Kikawada T. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. *IUBMB Life* 2011; 63(6): 419–29.
23. Watanabe M., Kikawada T., Okuda T. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *J. Exp. Biol.* 2003; 206: 2281–6.
24. Carpenter J.F., Crowe J.H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 1989; 28(9): 3916–22.
25. Oku K., Watanabe H., Kubota M. et al. NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125(42): 12739–48.
26. Berjak P., Farrant J.M., Pammenter N.W. Seed desiccation-tolerance mechanism. In: Jenks M.A., and Wood A.J., editors. *Plant Desiccation Tolerance*. Blackwell, Oxford; 2007. p 151–92.
27. Gusev O., Cornette R., Kikawada T. et al. Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki*. *Cell Stress & Chaperones* 2011; 16(1): 81–90.
28. Schill R.O., Steinbruck G.H., Kohler H.R. Stress gene (hsp70) and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages. *J. Exp. Biol.* 2004; 207:1607–13.
29. Liang P., MacRae T.H. The synthesis of a small heat shock/alpha-crystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development. *Dev. Biol.* 1999; 207: 445–56.
30. Reuner A., Hengherr S., Brahim M. et al. Stress response in tardigrades: differential gene expression of molecular shaperones. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15: 423–30.
31. Hong-Bo S., Zong-Suo L., Ming-An S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 45(3–4): 131–5.
32. Browne J., Tunnacliffe A., Burnell A. Plant desiccation gene found in a nematode. *Nature* 2002; 416: 38.
33. Hand S.C., Menze M.A., Toner M. et al. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu. Rev. Physiol.* 2011; 73: 115–34.
34. Tunnacliffe A., Wise M. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 2007; 94: 791–812.
35. Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 2005; 338: 151–7.
36. Cornette R., Kanamori Y., Watanabe M. et al. Identification of anhydrobiosis-related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (diptera; chironomidae). *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 35889–99.
37. Schokraie E., Hotz-Wagenblatt A., Warnken U. et al. Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PlosOne* 2010; 5:e9502.
38. Gusev O., Nakahara Y., Vanyagina V. et al. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: Linkage with radioresistance. *PLoS ONE* 2010; 5(11): e14008.
39. Jenks M.A., Wood A.J. *Plant desiccation tolerance*. Ames, Iowa: Blackwell Pub; 2007.
40. Reardon W., Chakraborty S., Pereira T.G. et al. Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC Mol. Biol.* 2010; 11: 6.
41. Gladyshev E., Meselson M. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *PNAS USA* 2008; 105: 5139–44.
42. Newmann S., Reuner A., Brummer F. et al. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 2009; 153: 425–29.
43. Cashio P., Lee T.V., Bergmann A. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2005; 16: 225–35.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №12-04-97071-р_поволжье/2012) и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

44. Natan D., Nagler A., Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. PLoS One 2009; 4(4): e5240.
45. Sasnoor L.M., Kale V.P., Limaye L.S. Prevention of apoptosis as a possible mechanism behind improved cryoprotection of hematopoietic cells by catalase and trehalose. Transplantation 2005; 80(9): 1251–60.
46. Sasnoor L.M., Kale V.P., Limaye L.S. A combination of catalase and trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to in vitro migration and adhesion properties. Transfusion 2005; 45(4): 622–33.
47. Ma X., Jamil K., Macrae T.H. et al. A small stress protein acts synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. Cryobiology 2005; 51(1): 15–28.
48. Furuki T., Shimizu T., Chakrabortee S. et al. Effects of Group 3 LEA protein model peptides on desiccation-induced protein aggregation. Biochim. Biophys. Acta. 2012; 1824(7): 891–7.
49. Watanabe M., Kikawada T., Fujita A. et al. Induction of anhydrobiosis in fat body tissue from an insect. J. Insect. Physiol. 2005; 51: 727–31.
50. Nakahara Y., Imanishi S., Mitsumasu K. et al. Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation. Cryobiology 2010; 60(2): 138–146.

Поступила 20.08.2012