УДК 57.043:577.218:59.085

UDC 57.043:577.218:59.085

Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих

Б. Фуллер[1], К.Грин[2], В.И. Грищенко[3]

[1]*Университетский колледж Роял Фри и медицинская школа,*
[2]*Институт медицинских исследований Нортвик Парк, г. Лондон*
[3]*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Cooling, Cryopreservation and Gene Expression in Mammalian Cells

B. Fuller[1], C. Green[2], V.I. Grischenko[3]

[1]*Royal Free & University College Medical School,*
[2]*Northwick Park Institute for Medical Research , London*
[3]*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

У многих прокариотических организмов, растений и таких простых беспозвоночных, как насекомые, отмечено изменение экспрессии генов в ответ на охлаждение, однако его влияние на клетки млекопитающих менее понятно. Цель данного обзора – описание реакций клеток млекопитающих на низкие температуры, которые необходимо учитывать при проведении терапевтических процедур с понижением температуры тела, при консервировании клеток и органов и при криоконсервировании. В общем холод указывает границу стрессорных реакций через определенные сигнальные пути, которые могут детерминировать выживаемость или гибель клеток. Очевидно, в условиях мягкой гипотермии существуют реакции, отражающие планомерную адаптацию к новому окружению, в то время как охлаждение вызывает более общую реакцию на стресс. Концепции, о которых идет речь, являются частью доклада на конференции Общества низкотемпературной биологии (2002, Лондон) "Хромосомы, гены и криобиология".

Ключевые слова: низкие температуры, гипотермия, криоконсервирование, генные продукты, стрессорный ответ.

У багатьох прокаріотичних організмах, рослинах и таких простих безхребетних, як комахи, відмічено зміни експресії генів у відповідь на охолодження, але його вплив на клітини ссавців менш зрозумілий. Мета цього огляду – опис реакцій клітин ссавців на низькі температури, що необхідно враховувати при проведенні терапевтичних процедур з пониженням температури тіла, при холодовому зберіганні клітин та органів і при кріоконсервуванні. Взагалі холод вказує межу стресорних реакцій через визначені сигнальні шляхи, що можуть детермінувати виживаність або загибель клітин. Очевидно, в умовах м'якої гіпотермії існують реакції, що відбивають планомірну адаптацію до нового оточення, у той час як охолодження викликає більш загальну реакцію на стрес. Концепції, про які йде мова, є частиною доповіді на конференції Товариства низькотемпературної біології (2002, Лондон) "Хромосоми, гени і кріобіологія".

Ключові слова: низькі температури, гіпотермія, кріоконсервування, генні продукти, стресорна відповідь.

Altered gene expression in response to cooling has been identified in many prokaryotic organisms, plants and lower invertebrates such as insects, but the effects in mammalian cells are less clearly understood. This review was undertaken to identify responses of mammalian cells to cold temperatures, such as might be encountered in therapeutic procedures where body temperatures are lowered, in preservation of cells and organs, and in cryopreservation. In general, cold elicits a range of stress responses through identified signaling pathways, which may determine the survival or otherwise of the cells. Under conditions of mild hypothermia, there is evidence for responses which reflect an ordered acclimation to the new environment, whilst deep cooling invokes a more general stress response. The concepts reported here form part of a presentation to the Society for Low Temperature Biology (2002, London) Meeting *Chromosomes, Genes and Cryobiology* .

Key-words: low temperatures; hypothermia; cryopreservation; gene products; stress response.

Многие живые организмы используют сложные стратегии, позволяющие им выжить в изменяющемся диапазоне температур [1]. Ответ на повышение температуры изучался на прокариотах и некоторых низших эукариотах (например, насекомых). Обычно тепловое воздействие приводит к индукции белков теплового шока (БТШ), семьи белков, которые являются общими

Many living organisms have adapted sophisticated strategies to allow their survival over a dynamic range of temperatures [6]. The response to elevated temperatures has been extensively studied in prokaryotic and some lower eukaryots such as insects, and generally involves the induction of heat shock proteins (HSPs), a family of proteins that are highly conserved between all organisms [20]. Many HSPs are

Адрес для корреспонденции:B. Fuller, Royal Free & University College Medical School, London, NW3 2QG, UK, тел: 00 44 (0)207 472 6111, e-mail: b.fuller@rfc.ucl.ac.uk

Address for correspondence: B. Fuller, Royal Free & University College Medical School, London, NW3 2QG, UK, tel: 00 44 (0) 207 472 6111, e-mail: b.fuller@rfc.ucl.ac.uk

для всех организмов [2]. Многие структуры БТШ, присутствующие при физиологически нормальных температурах, ведут себя как молекулярные шапероны, которые принимают участие в образовании и секреции полноценных белков [3]. В противоположность ответу БТШ механизмы, участвующие в ответе на влияние низких температур, менее изучены. Действие низких температур является одним из наиболее общих стрессов, которым подвергается целый класс растений и животных при ежегодных сезонных изменениях. Адаптивные реакции наблюдаются во многих систематических единицах, включая низших простых позвоночных, как на молекулярном, так и физиологическом уровнях [26]. Большое количество растительных генов индуцируется низкотемпературным стрессом, а у прокариотов холодовой стресс индуцирует некоторые хорошо изученные белки холодового шока (БХШ) [1]. В [4] приводятся данные о БХШ, в частности у насекомых. В дрожжах ответ на субфизиологические температуры был исследован многими учеными при использовании микроанализа ДНК и геномных технологий [5].

Низкие температуры широко используются для технологии практического консервирования клеток и тканей млекопитающих в биотехнологии и медицине. Цель данной технологии – снабдить живой, функционирующей клеткой процедуры манипуляции или имплантации с максимальным сохранением всех характеристик биообъектов. Вопросу генетических ответов на низкие температуры клеток млекопитающих и связанному с этим общему исходу криоконсервирования посвящено небольшое количество исследований. Такое состояние проблемы прямо противоположно положению в области консервирования и биотехнологии растений, где уже начат анализ связи чувствительности и ответа клетки на низкие температуры [9].

Данный обзор был предпринят для рассмотрения этой проблемы и попытки идентифицировать точки приложения будущих исследований важных для медицины систем человека и млекопитающих, которые могут использоваться для трансплантации или в терапевтических целях.

Необходимо отметить, что существует группа млекопитающих, сезонные императивы которых привели к развитию холодовой адаптации – это млекопитающие-гибернаторы. У этих видов развивается сложный комплекс генетических ответов вследствие нарушения характера питания, изменения длины светового дня и наступления зимы для обеспечения настоящего адаптивного ответа, изучением которого занимается физиология акклиматизации [3, 10]. Хотя детальное изучение процесса гибернации может дать много

constitutively expressed at physiologically normal temperatures and act as molecular chaperones, assisting in folding and secretion of mature proteins [13]. In contrast to the HSP response, the mechanisms involved in the response to low temperatures have been less thoroughly investigated. Exposure to low temperatures is one of the most common stresses experienced by a whole host of plants and animals with annual seasonal change. Adaptive responses can be measured across many phyla, including lower orders of vertebrates, both at the molecular and physiological level [26]. A number of plant genes are induced by low temperature stress, and in prokaryots, cold stress induces several well-characterised cold shock proteins (CSPs) [1]. A recent review has set out the current knowledge on CSPs, particularly in insects [29]. In yeasts, the response to sub-physiological temperatures has been investigated in a number of groups using DNA micro-array and genomic technologies [12].

On the other hand, low temperatures are widely used for pragmatic preservation technologies in areas of biotechnology and medicine, where the target cell or tissue is of mammalian origin. The goals of this technology are to provide a viable, functioning cell for manipulation or implantation, and the focus has been on optimising these characteristics. There has been little consideration to date about genetic responses to low temperatures in mammalian cells and how these may affect the overall outcome. This is in contrast to areas in plant conservation and biotechnology, where investigators are beginning to piece together the complex puzzle of how cells sense and respond to low temperatures [9]. The current review was undertaken to address this issue and try and identify where such research might go in the near future for systems of interest in medicine, i.e. human or mammalian systems which can be harnessed for transplantation or production of important therapeutics. It should be stated here that there is one group of mammals where seasonal imperatives *have* driven the evolution of cold adaptability – the mammalian hibernators. In these species, a complex array of genetic responses have developed during changes to feeding patterns, day length and onset of winter to provide a truly adaptive response which yields an *acclimated* physiology [10, 33]. However, whilst there are many interesting and important lessons to be learnt from understanding the hibernatory process, this knowledge is still infancy. In decades to come, an understanding of such molecular changes will cross-fertilize our approach to cell and tissue preservation, but right now we have to deal with *non-acclimated* cells in medical technology on a day-today basis, and this is the area which will be the focus of this review. In the majority of clinical applications, where complex structures such as whole organs are under consideration, low temperatures are

интересных и важных данных, оно все еще находится на начальной стадии. Впоследствии понимание этих молекулярных изменений усовершенствует наш подход к консервированию клеток и тканей, но в современной медицине приходится иметь дело с неакклиматизированными клетками, именно они будут рассматриваться в данном обзоре. В большинстве клинических исследований таких комплексных структур, как целые органы, низкие температуры ограничены температурами, при которых вода остается в жидком состоянии, и для удобства описания они были разделены на высокие (больше 30°C), средние (30-10°C) и низкие (10-0°C без замораживания), что необходимо для различения ответов клетки на охлаждение и ответов, которые зависят от холодового воздействия, но могут быть определены только после возвращения их к нормальным температурам. Приводится и обсуждается информация о генетических ответах систем млекопитающих на криоконсервирование.

Охлаждение как стрессорный фактор активации генов

Несомненно, нюансы метаболизма и репарации играют важную роль в функционировании теплокровных при нормальной температуре тела, близкой к 37°C. Практикующие врачи издавна придавали большое значение заметным изменениям температуры тела, что и до сих пор является правомерным. Падение температуры на несколько градусов у большинства теплокровных, к сожалению, может вызвать как сердечную, так и респираторную недостаточность [40]. При проведении серьезных операций и в период послеоперационного восстановления прилагаются огромные усилия, чтобы поддерживать температуру тела пациентов в жестких пределах. Тогда как это можно соотнести с применением гипотермии при температурах, близких к 0°C, для хранения органов и ткани для трансплантации? Почему мы считаем, что системы млекопитающих вообще способны реагировать на низкие температуры, предполагая что "дремлющий" метаболизм будет направлен на теплопродукцию для поддержания теплокровного состояния? Действительно, что означает термин "низкие" температуры в применении к клеткам млекопитающих?

Если не учитывать катастрофические воздействия *неконтролируемой* гипотермии всего тела, то наше восприятие термина "низкие" температуры ограничивается данными о таких основных процессах в клетках, как репликация и синтез белка. Слово *неконтролируемая* было выделено в данном контексте, потому что за последнее десятилетие накоплено достаточно доказательств

restricted to those in the liquid state down to 0-2°C (effectively the temperature of melting ice), and for ease of the following discussions, I have classed these as 'mild' (down to 30°C), 'moderate' (30-10°C) and 'deep' (10-0°C without freezing). It is important to distinguish here between responses which the cell institutes during cooling, and those which depend upon cold exposure but can only be detected after return to normal body temperatures. There is also some information on genetic responses of mammalian systems to cryopreservation, and this will also be considered.

Cooling as a stress for gene activation

For homeotherms, it is a *sine qua non* that the fine details of metabolism and repair are geared to function at a normal body temperature, close to the fabled '98.6°' (Fahrenheit, that is) of modern vernacular, or more commonly 37°C. Practicing physicians over the centuries have given great concern to a noticeable shift of body temperature, and rightly so. A fall by a few degrees in subjects unfortunate enough to be stranded in exposed cold environments can be fatal as respiratory and cardiac insufficiency set in [40]. Even to-day, a great deal of effort is taken to keep patients' core body temperatures within close limits during major surgery and post-operative recovery. How, then, can this be balanced with the application of hypothermia down to temperatures close to 0°C in the preservation of organs and tissue for transplantation? Why should we expect mammalian systems to be able to respond to low temperatures at all, given that much of resting metabolism is focused on heat production to maintain the homeothermic state? Indeed, what constitutes 'low' temperatures for a mammalian cell?

Apart from the catastrophic effects of *uncontrolled* whole body hypothermia, our perception of what constitutes 'low temperatures' is coloured by what we have learnt about basic cellular processes such as replication and protein synthesis. I have stressed the term *uncontrolled* in this context, because evidence has accumulated over the past decade which shows that by paying attention to certain fundamentals such as changes in blood rheology and oxygen diffusion at hypothermia, it is possible to successfully cool and resuscitate large animal species such as the dog to around 10°C [35]. This technology has, as far as I am aware, not yet been transferred to the clinical arena, but it does offer potential advantages where surgery in tissues sensitive to hypoxic damage (such as the brain) is undertaken. However, these results do show that low temperatures *per se* are not lethal. A similar conclusion can be drawn from the thirty year experience in renal transplantation, where many thousands of kidneys have been successfully

в пользу того, что если уделять внимание таким основополагающим факторам, как изменения в реологии крови и растворимости кислорода при гипотермии, то можно охлаждать до 10°С и оживлять крупных представителей животного мира, например собак [35]. Эта технология, насколько известно, еще не внедрена в клиническую практику, хотя она действительно имеет потенциальные преимущества при операциях на тканях, чувствительных к повреждению гипоксией (таких как мозг). Однако эти данные свидетельствуют, что низкие температуры сами по себе не являются летальными. Похожий вывод можно сделать исходя из 30-летнего опыта трансплантации почек, когда много тысяч почек успешно пересадили с предварительным охлаждением до 4°С с сохранением жизненных функций. Но все эти исследования были направлены на рассмотрение только физиологических функций. Лишь недавно стали возникать вопросы, как изменяется экспрессия генов во время или после различных режимов консервирования и каким образом это проявляется в более отдаленные сроки. Эти вопросы были обусловлены пониманием того, что холодовое хранение само по себе может быть одним из установленных факторов, влияющих на патофизиологические процессы в трансплантированном органе, и проявляться через годы после холодового воздействия [16].

Рассматривая уровень отдельной клетки, следует отметить известный факт, что охлаждение может ингибировать основополагающие процессы, вовлеченные в репликацию клетки. Исследования на клеточных линиях мыши показали, что деление клеток эффективно ингибируется при снижении температуры до 30°С [38], и при дальнейшем снижении температуры до среднего диапазона скорость деления клеток продолжает постепенно снижаться. Охлаждение влияет на все фазы клеточного цикла, а фаза G_1 является наиболее чувствительной: холодовое воздействие приводит к остановке развития клеток [36]. Считалось, что общее угнетение метаболизма происходит за счет этого ингибирования. Затем данное явление было пересмотрено с точки зрения усовершенствованных молекулярных технологий идентификации экспрессии генов. Fujita и соавторы [6, 22] показали, что трансляционные и транскрипционные процессы в клетках млекопитающих активно отвечают на температурный сдвиг до 30°С. В фибробластах мыши (и других типах клеток) на протяжении 6 ч температурного сдвига может быть обнаружен новый белок – индуцируемый холодом РНК-связывающий белок (ИХРБ) [22]. Несмотря на общую задержку в деградации пула мРНК в клетках при умеренной

transplanted after being cooled to 4°C and shown life-sustaining function. But, these observation have necessarily focused on physiological function. Only recently have questions begun to be asked about how gene expression might be altered during and after such preservation protocols, and what this means for the longer term outcome. These have been stimulated by an awareness that cold preservation itself can be one identified factor which can affect pathophysiological processes in the transplanted organ and detected years following the cold exposure [16].

To return to the level of the individual cell, it has been known for many years that cooling can inhibit the fundamental processes involved in cell replication. Studies on mouse cell lines demonstrated that cell division was effectively inhibited on reaching 30°C [38]. Growth rate gradually reduced at intermediate temperatures. All phases of the cell cycle are affected on cooling, although the G_1 phase seems most sensitive, with cells unable to progress [36]. It was initially thought that a general depression of metabolism accounted for this inhibition. More recently, the phenomenon has been revisited with the benefit of improved molecular techniques to identify gene expression. Fujita and colleagues [6, 22] have shown that mammalian cells actively respond to a shift in temperature down to the 30°C region by transcription and translation processes. In murine fibroblasts (and other cell types) a novel protein, designated cold-inducible RNA binding protein (CIRP) can be detected in cells within 6 hours of the temperature shift [22]. Even though there was a general delay in degradation of the mRNA pool within the cells during mild hypothermia, and the change in half-life of CIRP mRNA was not very different from other gene transcripts, the CIRP gene seemed to be preferentially transcribed during mild hypothermia. This suggests that the cells actively sense the mild cooling and respond by targeted gene activation. This hypothesis was further strengthened by work which has demonstrated tyrosine phosphorylation in proteins of Chinese hamster ovary (CHO) cells exposed to mild cooling [13]. Such specific phosphorylation is evidence of targeted post-translational modifications.

Our group have been interested in a different aspect of genetic response to cooling, that concerning the ability of cells to respond via transcription and/or translation to signaling mechanisms provided at low temperatures. The rationale for this type of work is that, under some circumstances, post-cooling function of cells may be enhanced by 'pre-conditioning' them to up-regulate stress responses. In experimental situations, this may be achieved by providing stimulation *before* the cells enter the cooling phase [37], but in many clinical situations it is not possible to provide this pre-cooling signaling. Thus it would be helpful to

гипотермии и небольшие отличия в изменении полупериода жизни мРНК ИХРБ от других генных транскриптов, оказалось, что транскрипция гена ИХРБ происходит преимущественно при умеренной гипотермии. Этот факт предполагает, что клетки активно реагируют на умеренное охлаждение направленной активацией генов. Данная гипотеза была подкреплена работой, которая продемонстрировала фосфориляцию тирозина в белках овариальных клеток китайского хомячка (ОКХ), подвергавшихся умеренному охлаждению [13]. Такая специфическая фосфориляция свидетельствует о направленных посттрансплантационных модификациях.

Наша исследовательская группа заинтересовалась отличающимися аспектами генетического ответа на охлаждение, который относится к способности клеток отвечать посредством транскрипции и/или трансляции на сигнальные механизмы, обеспечиваемые низкими температурами. Предпосылкой такой работы является то, что при некоторых обстоятельствах функционирование клеток после охлаждения может быть улучшено предварительным выдерживанием их в определенных условиях для позитивной регуляции ответных реакций на стресс. В экспериментах это может быть достигнуто стимулированием клеток *до того*, как они войдут в фазу охлаждения [37], однако во многих клинических случаях невозможно обеспечить такой сигнал перед охлаждением. Поэтому целесообразно идентифицировать диапазон охлаждения, который позволил бы инициировать эту необходимую стрессорную реакцию. Мы исследовали позитивную регуляцию гемоксигеназы-1 (ГО-1, БТШ-21) на модели холодового хранения и трансплантации почки кролика, и результаты показывают, что существует некоторое преимущество такого подхода с предварительным сигналом [1]. Однако позитивную регуляцию удалось стимулировать уже и при нормальной температуре тела. Мы также исследовали активность ГО-1 в эпителиальных клетках почек свиньи в ответ на различные агонисты (данные не опубликованы) в течение 6 ч при различных температурах. Оптимальная стимуляция клеток при 37°С приводила к повышению активности белка ГО-1 до 570%, а при 30°С наблюдалось увеличение активности до 200%, которое статистически достоверно отличалось от нормального уровня при $p<0,05$. При 20°С уровень активности составлял 140% и достоверности отличий от нормального уровня не было отмечено. Таким образом, наши предварительные результаты согласуются с данными [1, 37], показывающими, что клеткам млекопитающих присущи процессы активного продуцирования сигналов при щадящем охлаж-

identify a range of cooling which will allow initiation of such helpful stress responses. We have investigated up-regulation of haeme oxygenase-1, (Heat shock protein 21) in a rabbit kidney model of cold preservation and transplantation, and our preliminary results suggest that there is some benefit to this pre-emptive approach [1]. However, the upregulation was stimulated at normal body temperatures. We have also studied haeme oxygenase-1 activities in porcine renal epithelial cells in response to various agonists (unpublished data) for 6h at different temperatures. Optimal stimulation in the cells at 37°C resulted in an increase of HO-1 protein activity of 570%, whilst at 30°C, there was an increase to 200%, which was statistically significant at a level of $P<0.05$. At 20°C, the activity level was 140%, which did not reach statistical significance. Thus our preliminary findings would fit with the previous data showing that mammalian cells are capable of active signaling processes during mild cooling. The intriguing question is whether conditions of time or agonist mixtures can be manipulated to allow significant responses in the moderate cooling range, which would be more helpful in the clinical setting. From studies on RNA and protein synthesis in hepatoblastoma cells [24] there may be some optimism for such approaches; whilst both RNA and protein synthesis were significantly reduced by cooling to 27°C, there was still some 70% of detectable activity at this tempeature.

Aspects of biotechnology are also concerned with gene expression during cooling, where enhanced or prolonged production of important proteins by batch cultures are under consideration. For example, a shift to mild cooling provided higher production yields of a model product (secreted alkaline phosphatase) in CHO cells [13] by prolonging the production phase. However, this is not a universal finding, and in other studies [34] culture under mild cooling was reported to result in loss of monoclonal antibody production. It would again seem that control of many variables may be required to optimise the effects of cooling on expression of specific gene products.

Moving from moderate to deep cooling (below 10°C), the processes of transcription and translation become effectively inhibited, at least on the time scales usually studied. Deep cooling is associated with such a range of alterations in cell ultrastructure and function [7] that it is unsurprising that multi-component processes such as protein synthesis are halted. In fact, very few studies have been made on protein synthesis in mammalian cells below 10°C where the strong inhibition was observed from the high activation energies measured at these temperatures [5]. Rather than new synthesis, the stability of transcripts and proteins becomes an issue, because in some circumstances an activation of proteolytic enzymes has been demonstrated after prolonged cold exposure. For

дении. Немаловажным является вопрос, можно ли манипулировать временными условиями или составом смесей агонистов для получения значительной ответной реакции в диапазоне умеренного охлаждения, что было бы очень полезно при клиническом применении. Из исследований РНК и синтеза белка на клетках гепатобластомы [24] можно сделать вывод, что такие подходы могут быть полезными; в то время как синтез РНК и белка значительно снижался при охлаждении до 27°С, при этой температуре все еще обнаруживалась 70%-ная активность.

Биотехнологические аспекты также касаются экспрессии генов при охлаждении, увеличенной или пролонгированной выработке белков серийными культурами. Например, сдвиг в сторону щадящего охлаждения обеспечивал более высокий выход продукции модельного продукта (секретированной алкалин фосфатазы) в ОКХ [13] из-за продления фазы продуцирования. Однако нельзя говорить об универсальности этих данных: в исследованиях [34] показано, что щадящее охлаждение культуры приводило к потере продукции моноклональных антител. Можно заключить, что необходимо контролировать множество переменных для оптимизации воздействия охлаждения на экспрессию специфических генных продуктов.

При переходе от умеренного к глубокому охлаждению (ниже 10°С) процессы транскрипции и трансляции существенно ингибируются, по крайней мере, в рамках обычно исследуемой временной шкалы. Глубокое охлаждение связано с широким диапазоном изменений в ультраструктуре и функциях клетки [7], поэтому неудивительно, что такие многокомпонентные процессы, как синтез белка, останавливаются. Действительно очень мало исследован синтез белка на клетках млекопитающих при температурах ниже 10°С, при которых наблюдается сильное ингибирование из-за наличия высоких энергий активаций [5]. Предметом обсуждения становится скорее стабильность транскриптов и белков, чем их новый синтез, так как в некоторых условиях после пролонгированной холодовой экспозиции показана активация протеолитических ферментов. Например, нами отмечена активация фермента желатиназы при холодовом хранении печени в клинике [27], а также обнаружена 20%-ная потеря специфической активности для ГО-1 в ткани почки через 24 ч хранения при 4°С [1]. Стабильность мРНК в условиях глубокого охлаждения изучена недостаточно. Наши предварительные исследования свидетельствуют, что уровни мРНК для определенных управляющих генов и белков молекул адгезии (часть ответной реакции) не изменялись в клеточных линиях печени через 18 ч

example, we demonstrated activation of a gelatinase enzyme in clinical liver cold storage [27], and also found that in kidney tissue, there was a loss of some 20% of specific activity for HO-1 over 24h at 4°C [1]. Stability of mRNA under conditions of deep cooling has been less well investigated. Our preliminary data suggest that levels of mRNA for certain 'house keeping' genes and for adhesion molecule proteins (part of the stress response) did not change in liver cell lines over 18h at cold temperatures. Similarly, in human liver, mRNA for a constitutive enzyme in the endoplasmic reticulum was unchanged over 10h (unpublished observations). However, there is a great deal more to be understood about control of gene products in mammalian cells under deep cooling before a generalised statement can be made.

If deep cooling is truly the *ne plus ultra* stage for gene-orientated molecular processes in mammalian cells, what happens in the aftermath? Most pragmatic cold storage protocols for tissues or organs are based on the optimistic assumption that protein expression and function is restored on return to normal body temperatures. It certainly seems the case that if the cold exposure (below 10°C) is brief (<2h), no significant alteration in overall protein synthesis was observed [4] on return to warm temperatures. Whilst overall synthesis may remain unchanged, up-regulation of specific proteins of the stress response has been clearly shown after deep cooling. An early study demonstrated synthesis of heat shock proteins (HSP) in skin biopsies rewarmed after deep cooling [11]. In human fibroblasts, Liu *et al* [18] showed that cooling to 4°C and return to warm incubation for 5h resulted in production of a range of (HSP). Relative synthesis of HSP remained high over 8h on rewarming, and then gradually returned to baseline values. Similarly, in rat cardiomyocytes, cooling to 4°C for 1h and rewarming for 2h enhanced expression of mRNA for HSP70, and of the protein detected by Western blot [15]. An increase in mRNA for HSP25 was also seen. Another stress pathway (the p53 gene dependent WAF1 protein, which can cause cell cycle G1 arrest) was activated in glioblastoma cells after 1-2h at 4°C and 6h at 37°C [23]. The authors hypothesised that this might be a protective mechanism to maintain homeostasis and an orderly return to cell cycle progression after a repair period. Indeed, Ota *et al.* demonstrated that cold shock could provide protection in mouse skin and cultured keratinocytes against a subsequent genotoxic stress on rewarming [25]. Thus the accumulating evidence (although by no means conclusive) suggests that after 'brief' or 'tolerable' cold shock , mammalian cells may switch on stress mechanisms which assist in a post-cooling repair period to restore cell function. The sensing mechanisms are likely to be multiple, and include factors such as altered pH, production of

при холодовых температурах. Подобно этому в печени человека уровень мРНК для определяющего фермента в эндоплазматическом ретикулуме не изменялся через 10 ч (данные не опубликованы). Однако гораздо больше следует уделять внимания анализу управления генными продуктами в клетках млекопитающих при глубоком охлаждении, прежде чем можно будет выдвинуть обобщающий вывод.

Если глубокое охлаждение действительно непревзойденная стадия для генориентированных молекулярных процессов в клетках млекопитающих, что же происходит впоследствии? Наиболее прагматичные протоколы холодового хранения для тканей и органов основаны на оптимистическом допущении, что экспрессия и функция белка восстанавливаются при возврате к нормальным температурам тела. Действительно оказывается, что при кратковременной (<2ч) холодовой экспозиции (ниже 10°С) не наблюдается значительного изменения в общем синтезе белка после возврата к более высоким температурам. В то время как уровень общего синтеза может оставаться неизменным, явно продемонстрирована позитивная регуляция специфических белков стрессорной реакции после глубокого охлаждения. В [11] отмечен синтез БТШ в биоптатах кожи, отогретых после глубокого охлаждения. На фибробластах человека Liu и соавторы [18] показали, что охлаждение до 4°С и возврат к тепловой инкубации на 5 ч приводили к выработке целого диапазона БТШ. Относительный уровень синтеза БТШ оставался высоким после 8 ч повторного нагрева и затем постепенно возвращался к базовому. На кардиомиоцитах крысы показано, что охлаждение до 4°С в течение 1 ч и последующий отогрев в течение 2 ч привели к повышению экспрессии мРНК для БТШ 70 и белка, обнаруженного тестом Western blot [15]. Такое же увеличение экспрессии мРНК наблюдалось и для БТШ25. Другой стрессорный путь (зависящий от гена p53 белок WAF1, который может вызывать остановку клеточного цикла G_1) был активирован на клетках глиобластомы после 1-2 ч экспозиции при 4°С и затем 6 ч при 37°С [23]. Авторы высказали идею, что это может быть защитным механизмом для поддержания гомеостаза и контролируемого возврата к развитию клеточного цикла после периода восстановления. Действительно, Ota и соавторы продемонстрировали, что холодовой шок может обеспечить защиту от гентоксического стресса, следующего за отогревом в коже мыши и культивированных кератиноцитах [25]. Таким образом, накопленные доказательства (хотя, конечно, они не являются окончательными) предполагают, что после “короткого” или “переносимого” холодового шока

oxygen free radicals, accumulation of damaged proteins and redox disbalance, all of which can induce stress responses without cooling. There is as yet no one identified factor of induction which can be linked solely to cold exposure. However, recent work has demonstrated that nuclear transcription factors (in this case NF-kB) may be translocated to the nucleus within minutes of exposure at 4°C [30]. Such transcription factors are central to initiating stress pathways, and also in the development of anti-apoptotic pathways. The mechanism for cold-sensing in such a short time remains unclear, but it is difficult to believe it could be due to altered metabolism. Perhaps a rapid change in ion homeostasis (such as intracellular calcium) could be responsible, but this is pure conjecture.

What happens when deep cooling becomes ‘intolerable’? Following very prolonged cold exposure, progressive cold necrosis and autolysis sets in, which render the cells non-recoverable, even without rewarming. However, in many mammalian cells, this point is not reached before at least 72h of deep cooling. Before that time, stress pathway activation on cooling and gene product accumulation during early rewarming may be the branch-point which decides the fate of the cells. As alluded to above, NF-kB may control anti-apoptotic mechanisms, but under different conditions it can direct up-regulation of inflammatory factors such as adhesion molecules, which assist targeting of damaged cells by the immune system in the body, a central step to their elimination. We have been interested in looking at such adhesion molecules (ICAM-1 and E-selectin) in liver cells and the whole organ during and after deep cooling. Our data so far do suggest that increased expression of adhesion molecules can be detected after short (4h) deep cooling and rewarming, and that this increases with time over 24h. An example of the findings is shown in Table 1. Cold hypoxia and rewarming induced a marked up-regulation of mRNA for ICAM-1 in a cultured liver cell line. This was inhibited by providing anti-oxidants to the cells in the pre- and post-hypothermic stress period (i.e. loading the cells to maximise their anti-oxidant capacities. Both water soluble (N-acetyl cysteine) and lipid soluble (α-tocopherol) agents were effective. These studies suggest that the signaling mechanisms here for adhesion molecule induction may be free radical mediated secondary to cold hypoxic stress, rather than a direct temperature effect, but we do not yet possess a complete understanding of the scenario.

It has also been demonstrated that apoptosis can be switched on under similar conditions of deep cooling in liver parenchymal cells and endothelial cells [28], and this was linked to generation of oxygen-derived free radicals during the rewarming phase. In addition, activation of the p53 pathway by cooling has also been

в клетках млекопитающих могут запускаться стрессорные механизмы, которые обеспечивают возобновление клеточных функций в восстановительный период после охлаждения. Механизмы чувствительности, скорее всего, являются многофакторными и включают такие компоненты, как изменения pH, образование свободных радикалов кислорода, накопление поврежденных белков и окислительно-восстановительный дисбаланс, каждый из которых может индуцировать ответ на стресс без охлаждения. На данный момент не существует установленного фактора индукции – единственного, который был бы связан с холодовой экспозицией. Однако в [30] продемонстрировано, что ядерные транскрипционные факторы (в данном случае NF-kB) могут быть перемещены в ядро в течение нескольких минут экспозиции при 4°C. Такие факторы транскрипции являются центральными в инициации стрессорных метаболических путей, а также в развитии антиапоптотических путей. Механизм развития холодовой чувствительности в такие короткие сроки остается неясным, но сложно предполагать, что он может зависеть только от изменений в метаболизме. Вероятно, на него могут оказывать влияние быстрые изменения ионного гомеостаза (например, концентрации внутриклеточного кальция), однако это остается простой догадкой.

Что же происходит, когда глубокое охлаждение преодолевает порог толерантности? После очень продолжительной холодовой экспозиции начинается развитие холодового некроза и аутоза, что приводит к невозможности восстановления клеток. Однако во многих клетках млекопитающих это состояние не достигается, по крайней мере, в течение 72-х часов глубокого охлаждения. В этот период активация стрессорных метаболических путей в ответ на охлаждение и накопление генных продуктов в ранние сроки после отогрева может быть точкой разветвления, которая решает судьбу клетки. Как упоминалось выше, NF-kB может контролировать антиапоптотические механизмы, но в разных условиях он может направлять позитивную регуляцию таких воспалительных факторов, как молекулы адгезии, которые способствуют мечению поврежденных клеток с помощью иммунной системы организма, что является основным этапом элиминации. Мы заинтересовались рассмотрением этих молекул адгезии (ICAM-1 и E-селектин) в клетках печени и целом органе при глубоком охлаждении и после него. Пока наши данные показывают, что повышенная экспрессия молекул адгезии может быть обнаружена после непродолжительного (4 ч) глубокого охлаждения и повторного нагрева и этот процесс нарастает через 24 ч. Некоторые из наших результатов приве-

suggested as a route for directing apoptosis and elimination of damaged cells [8]. It has been known for some years that cold shock can induce apoptosis in cells at susceptible stages of the cell cycle [32] and this may explain in practical terms why significant apoptosis has been found after some conditions of deep cooling but not in others.

Genetic responses to cryopreservation

Since cooling can induce gene responses, it is not surprising that cryopreservation might induce similar effects. The multiple stresses of a cryopreservation protocol – osmotic stresses during addition or removal of cryoprotectants (CPA), deep cooling during CPA equilibration, residual chemical effects of CPA during the early rewarming period – may all be seen as potential signaling factors. Given this, there have been surprisingly few studies in this area. Freezing to very low temperatures under sub-optimal conditions (in the absence of cryoprotectant) was shown to be associated with DNA damage in suspension of human Cumuls cells (which normally surround the developing oocyte in the female), measured by electrophoretic pattern changes in the Comet assay [17]. Addition of glycerol as cryoprotectant significantly reduced the indices of DNA damage, and went hand in hand with improved cell viability on thawing. Since the comet assay was performed immediately on rewarming, it would seem likely that the observed changes were due to cryobiological effects rather than secondary to cell degeneration in culture after thawing. However, in cells with normal viability, there is a continual homeostatic balance between DNA damage and compensatory repair mechanisms, so this study does not tell us anything about long-term DNA damage from cryopreservation in cells with an adequate capability for DNA repair. It was shown that cryopreserved hepatocytes, on rewarming, could respond to a similar degree as fresh cells by switching on DNA repair mechanisms after cell exposure to genotoxic chemicals [31]. More recently, a study in bovine oocytes [21] demonstrated (again using the single-cell comet assay) that DNA damage could be detected early after thawing. Different cryopreservation regimes (slow cooling or vitrification) showed differences in DNA susceptibility. Such observations will become increasingly important in the future with the hoped-for progress towards the use of pluripotent stem cells to treat a variety of clinical disorders. Also, in the moves towards reproductive cloning, it will be vitally important to understand any damage to the genome in the somatic cell nuclei used for the cloning (if the source of this cell is from a cryopreserved bank).

A more detailed study on cryopreservation of fibroblasts frozen either as cell suspensions or as three-dimensional cultures showed differences in response

дены в таблице. Холодовая гипоксия и отогрев индуцировали заметную позитивную регуляцию экспрессии мРНК для молекулы ICAM-1 в культивированной линии клеток печени. Этот процесс ингибировался введением антиоксидантов в клетки в период пре- и постгипотермического стресса (т.е. при нагрузке клеток для максимизации их антиоксидантных свойств). Эффективны как водорастворимые (N-ацетил цистеин), так и липидорастворимые агенты (α-токоферол). Эти исследования показывают, что механизмы продуцирования сигналов для индукции молекул адгезии в этом случае могут быть опосредованы свободными радикалами после холодового гипоксического стресса, а не непосредственно температурным воздействием, но полной ясности в этом вопросе еще нет.

Экспрессия мРНК ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1 – молекула межклеточной адгезии 1) в культивируемых клетках HepG2, выраженная как отношение интенсивности экспрессии мРНК к экспрессии к гену GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат)

Expression of ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) mRNA in cultured HepG2 cells as a ration of mRNA intensity in comparison to the house-keeping gene GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate)

Обработка Treatment	Отношение мРНК ICAM – 1 к GAPDH Ratio of mRNA ICAM – 1 to GAPDH		
	Нормальные клетки Normal cells	Клетки, обработанные N – ацетил цистеином Cells treated with N – acetyl cysteine	Клетки, обработанные α – токоферолом Cells treated with α – tocopherol
Клеточная культура (культивирование 24 ч, отмывка, культивирование 4 ч при 37°C) Cell cultures (24h,washed,and 4h at37°C)	108.3±9.6%	97.3±4.6%	104.5±8.9%
Клеточная культура (культивирование 24 ч,16 ч холодовой гипоксии при 4°C, отмывка, культивирование 4 ч при 37°C) Cell cultures (24h,16h cold hypoxia at 4°C ,washed and 4h at 37°C	286.1±14.3%	127.7±9.3%*	143.6±12.1%*
Культура контрольных клеток (культивирование 48 ч после пассажа при 37°C) Control cells cultured (48h after passage) at 37°C	111.7±10.2%	104.8±11.6%	106.3±6.9%

* – различие с p<0,01 при сравнении с нормальными клетками в тех же условиях.

Клетки HepG2 культивировали в модифицированной среде Игла Дюльбекко с 10%-й телячьей фетальной сывороткой. Для индукции холодовой гипоксии среду замещали охлажденным раствором Университета Висконсин и клетки выдерживали при 4°C в атмосфере азота в течение 16 ч. Затем культуру клеток отмывали чистым DMEM и переносили в 37°C. В некоторых экспериментах антиоксиданты N-ацетилцистеин или б-токоферол (1 мМ каждый) были добавлены до и после холодовой гипоксии. Эстрагировали РНК и проводили обратную полимеразную цепную реакцию с использованием наборов для ICAM-1 и GAPDH, полосы на агарозном геле после электрофореза определяли с помощью флюоресценции.

Не отмечено изменений в экспрессии ICAM-1 в контрольных культурах и культурах с добавками антиоксидантов и проведенных через процедуры отмывки. В клетках, подвергнутых холодовой гипоксии, уровень ICAM-1 существенно повышается при отогреве, тогда как добавление антиоксидантов ингибирует это изменение.

* denotes a difference at $P<0.01$ vs normal cells under the same conditions.

HepG2 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium with 10% fetal calf serum. To induce cold hypoxia, the medium was replaced with cold University of Wisconsin solution and the cells maintained under nitrogen gas at 4°C for 16h. The cultures were then washed with fresh DMEM and returned to 37°C. In some experiments, antioxidants N-acetyl cysteine or б-tocopherol (1mM each) were added prior to, and after, cold hypoxia. Total RNA was extracted and reverse transcription polymerase chain reaction performed using commercial primers for ICAM-1 and GAPDH, with fluorescence detection of bands on agarose gel electrophoresis.

There were no changes in ICAM-1 expression in control cultures or those cultured with anti-oxidants and taken though the washing steps. In cells exposed to cold hypoxia, ICAM-1 increased significantly during rewarming, whilst the addition of anti-oxidants inhibited this change.

Также было показано, что апоптоз может включиться в подобных условиях глубокого охлаждения в паренхимальных и эндотелиальных клетках печени [28], и авторы связывали это с образованием свободных радикалов кислородного происхождения в течение фазы отогрева. Активация пути p53 охлаждением также полагалась в качестве механизма для направленного апоптоза и элиминации поврежденных клеток [8]. Известно, что холодовой шок может индуцировать апоптоз в клетках на чувствительных стадиях клеточного цикла [32] и это может прояснить, почему при некоторых условиях глубокого охлаждения был обнаружен высокий уровень апоптоза, тогда как при других нет.

Ответные реакции генов на криоконсервирование

Поскольку охлаждение индуцирует ответные реакции генов, неудивительно, что криоконсервирование может вызывать подобные эффекты.

between the two models [19]. An increase in HSP (HSP 27, 70, 90) was detected as early as 20 min after thawing and return to normal culture. These changes then returned to baseline over 5 day in culture [19]. In general there was a decrease on overall RNA and protein synthesis on the first post-cryopreservation day, and these again gradually returned to control values over the subsequent days. Several of the

Многочисленные стрессорные воздействия процедуры криоконсервирования (осмотический стресс при добавлении или удалении криопротекторов, глубокое охлаждение во время эквилибрации с криопротекторами, остаточные химические эффекты криопротекторов в начальный период повторного отогрева) могут также рассматриваться как потенциальные сигнальные факторы. В этой связи удивляет небольшое количество исследований в этой области. Была показана связь замораживания до очень низких температур при субоптимальных условиях (при отсутствии криопротектора) с повреждением ДНК в суспензии клеток кумулюса человека (которые обычно окружают развивающуюся яйцеклетку), на что указывают изменения в электрофоретических образцах в анализе Комет [17]. Добавление глицерина как криопротектора значительно снижало показатели повреждения ДНК, что происходило параллельно с улучшением выживаемости клеток при оттаивании. Так как анализ Комет проводился непосредственно после отогрева, естественно предположить, что эти изменения происходили скорее из-за криобиологических воздействий, чем вторичных, вызванных клеточной дегенерацией в культуре после отогрева. Однако в клетках с нормальной жизнеспособностью наблюдается устойчивый гомеостатический баланс между повреждением ДНК и компенсаторными механизмами восстановления. Таким образом, это исследование не дает новых данных о длительном повреждении ДНК, вызванном криоконсервированием в клетках с адекватной способностью восстанавливать ДНК. Было показано, что криоконсервированные гепатоциты после отогрева имеют такие же ответные реакции, как и свежевыделенные клетки, что достигается включением механизмов восстановления ДНК после воздействия генотоксичных химикатов [31]. В работе на яйцеклетках коровы [21] отмечено (с использованием одноклеточного анализа Комет), что повреждение ДНК может быть обнаружено сразу же после оттаивания. Применение различных режимов криоконсервирования (медленное охлаждение или витрификация) показало различия в чувствительности ДНК. Такие наблюдения будут иметь большое значение в будущем для использования плюрипотентных стволовых клеток при лечении различных клинических нарушений. При развитии репродуктивного клонирования будет жизненно необходимо знать о любых последствиях повреждения генома в ядрах соматических клеток, используемых для клонирования (если клетки получены из низкотемпературного банка).

Более детальное исследование криоконсервирования фибробластов, замороженных как в виде

changes in HSP could be detected on exposure of the cells to CPA (Me_2SO) and cooling before cryopreservation, but the changes did not exactly match those in the cells taken through the entire cryopreservation protocol. Interestingly, in the 3-D cultures, mRNA for various growth factors (such as vascular endothelial cell growth factor) were up-regulated over the first 2 days following thawing, and may have resulted from increased signaling through MAPK (mitogen activated protein kinases), which were also detected.

Perhaps a similar pattern of gene expression for stress responses follows cryopreservation as after deep cooling – pathways which can act to permit recovery of 'tolerable' injury, but which can go on to eliminate terminally damaged cells. Certainly, activation of apoptosis has been identified following cryopreservation [2, 3]. Transcripts for apoptosis-involved enzymes (caspases) were increased over 6-18h following thawing in cultured human fibroblasts [2], suggesting that apoptosis may be one mechanism for elimination of sub-lethally damaged cells. Another question which is beginning to be considered in mammalian cells following cryopreservation is that of the stability of the genome. Particularly in areas of reproductive biology, where gametes or embryos are being cryopreserved as part of infertility treatments or for banking of animal species, it will be important to fully investigate genetic effects of cryopreservation both in the short term and on long-term outcomes. The circumstantial evidence accumulated so far from two decades over which cryopreserved embryos have been implanted in a various species is encouraging, with no higher frequencies of genetic abnormalities consistently reported, but this does not constitute conclusive proof. More detailed investigations, for example, in sperm, are now beginning to be made [13, 39], and we must await the outcomes.

Conclusion

From the above review, it will be obvious that there remain many unanswered questions about the genetic impact of cooling and cryopreservation on mammalian cells. The new technologies which have sprung up to address questions about the human genome, and how genotype affects phenotype have yet to be applied in depth to mammalian cryobiology. In this respect, plant cryobiology has surged ahead (see the Review in [9]). Some of these differences in philosophy between the disciplines reflect practical and logistical differences such as the deep interest within plant cryobiology in maintaining the genetic stability of important inbred crop species through many seasonal generations, whilst clinical cryobiologists are dealing with outbred populations with a prolonged generation time. However, the 'long view' in mammalian cryobiology is beginning

клеточных суспензий, так и трехмерных культур, показало различие в ответной реакции между двумя моделями [19]. Увеличение содержания БТШ (БТШ 27, 70, 90) определялось через 20 мин после оттаивания и начала культивирования в нормальных условиях. Этот показатель затем возвращался к исходным значениям после 5 дней культивирования [19]. Наблюдалось снижение содержания общей РНК и синтеза белка в первый день после оттаивания и восстановление до контрольных значений в течение последующих дней. Некоторые изменения содержания БТШ могли определяться после экспозиции клеток в растворах криопротекторов (ДМСО) и охлаждения перед криоконсервированием, но эти изменения не совпадали полностью с изменениями в клетках после полного цикла криоконсервирования. Интересно отметить, что в трехмерных культурах экспрессия мРНК для различных ростовых факторов (например, сосудистого эндотелиального ростового фактора) позитивно регулируется через первые два дня после оттаивания, что может быть результатом усиленной передачи сигналов посредством митоген-активированных белковых киназ, также обнаруженных в образцах.

Возможно, подобный путь экспрессии генов в ответ на стресс следует за криоконсервированием после глубокого охлаждения и позволяет восстановить "обратимое" повреждение, но в то же время способен запустить уничтожение необратимо поврежденных клеток. Необходимо отметить, что после криоконсервирования обнаружена активация апоптоза [2, 3]. Через 6-18 ч после оттаивания в культивированных фибробластах человека [2] увеличивалась транскрипция вовлеченных в апоптоз ферментов (каспаз), что предполагает возможность участия апоптоза в уничтожении сублетально поврежденных клеток. Другим вопросом, который начинают рассматривать в исследованиях клеток млекопитающих после криоконсервирования, является стабильность генома. В частности, в репродуктивной биологии гамет и эмбрионов при криоконсервировании в программах лечения бесплодия или создания банков видов животных важно детально исследовать генетические воздействия криоконсервирования как при краткосрочном, так и длительном хранении. Наблюдения, накопленные за два десятилетия, в течение которых было проведено множество имплантаций криоконсервированных эмбрионов различных видов, являются обнадеживающими: в изученных случаях частота генетических отклонений была невысокой, хотя это и не является окончательным доказательством. Более обстоятельные исследования, в частности спермы, начинают проводиться только сейчас [14, 39].

to shift to take account of these important new questions.

Acknowledgements: *The ideas in this review were stimulated by the activities of the UNESCO Chair in Cryobiology, at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Ukraine Academy of Sciences, Kharkov. Part of the work formed the basis of a presentation to the Society for Low Temperature Biology Annual Meeting, London, 2002. I would like to thank many colleagues for their input and discussions, including B. Davidson, V. Hoang and M. El Wahsh (Royal Free-UCL), & R. Motterlini (Northwick Park Institute for Medical Research).*

References

1. *Balogun L., Foresti R., Shurey C. et al.* The role of heme oxygenase-1 (HO-1) during cold storage and renal autograft transplantation in rabbits // Cryobiology.– 2002.– Vol.45, N4.– P. 265-266.
2. *Baust J., Van Buskirk R., Baust G.* Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis // In Vitro Dev. Biol.– Animal.– 2000.– Vol. 36, N4.– P. 262-270.
3. *Borderie V., Lopez M., Lombet A. et al.* Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.– 1998.– Vol. 39, N8.– P. 1511-1519.
4. *Burdon R.* Thermotolerance and the heat shock proteins // In: Temperature and Animal Cells. Eds. K. Bowler and B. Fuller.– Cambridge: Company of Biologists Press, 1987.– P. 113-133.
5. *Craig N.* Regulation of translation in rabbit reticulocytes and mouse L-cells; comparison of the effects of temperature // J. Cell Physiol.– 1975.– Vol.87, N2.– P. 157-166.
6. *Fujita J.* Cold shock response in mammalian cells // Microbiol. Biotechnol.– 1999.– Vol. 1.– P. 243-255.
7. *Fuller B.* Organ preservation : the profit and loss account of using hypothermia to maintain viability // Transplant Rev.– 1999.– Vol. 13.– P. 55-66.
8. *Gregory C.D., Milner A.E.* Regulation of cell survival in Burkitt lymphoma: implications from studies of apoptosis following cold-shock treatment // Int. J. Cancer.– 1994.– Vol. 57, N3.– P. 419-426.
9. *Harding K., Staines H.* Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation // Cryo Letters.– 2001.– Vol. 22, N4.– P. 255-262.
10. *Hittel D., Storey K.B.* The translation state of differentially expressed mRNAs in the hibernating 13-lined ground squirrel (Spermophilus tridecemlineatus) // Arch. Biochem. Biophys.– 2002.– Vol. 401, N2.– P. 244-254.
11. *Holland D., Roberts S., Wood E.J., Cunliffe W.* Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes // J. Invest. Dermatol.– 1993.– Vol. 101, N2.– P. 196-199.
12. *Homma T., Iwahashi H., Komatsu Y.* Yeast gene expression during growth at low temperature // Cryobiology.– 2003.– Vol. 46, N3.– P. 230-237.
13. *Kaufman H., Mazur X., Fussenegger M., Bailey J.* Influence of low temperatures on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells // Biotechnol. Bioeng.– 1999.– Vol. 63.– P. 573-582.
14. *Kusakabe H., Szczygiel M., Whittingham D., Yanagimachi R.* Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.– 2001.– Vol. 98, N24.– P. 13501-13506.
15. *Laios E., Rebeyka I.M., Prody C.* Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat

Выводы

Из приведенного обзора очевидно, что без ответа остается еще множество вопросов о генетическом воздействии охлаждения и криоконсервирования на клетки млекопитающих. Новые технологии, позволяющие детально изучить человеческий геном и то, как генотип воздействует на фенотип, еще не нашли должного применения в криобиологии млекопитающих. В этом отношении успехи криобиологии растений более значительны [9]. Разница в подходах между этими двумя дисциплинами зависит от практических и логических отличий, так, например, в криобиологии растений определяющей является заинтересованность в поддержании генетической стабильности важных инбредных природных видов зерновых в течение многих сезонных поколений, тогда как криобиологи, работающие с клиническим материалом, чаще всего имеют дело с аутбредными популяциями с большим сроком жизни поколений. Однако криобиология млекопитающих начинает концентрировать внимание на этих важных вопросах как перспективных исследованиях.

Благодарность: *Идея написания данного обзора стимулирована деятельностью кафедры ЮНЕСКО по криобиологии при Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков. Часть работы была положена в основу доклада на ежегодном заседании Общества низкотемпературной биологии, Лондон, 2002. Авторы хотели бы поблагодарить многих коллег за их вклад в эту работу и обсуждение, включая B. Davidson, V. Hoang и M. El Wahsh (госпиталь Роял Фри, Университетский колледж Лондона), а также R. Motterlini (Институт медицинских исследований Нортвик Парк).*

References

1. *Balogun L., Foresti R., Shurey C. et al.* The role of heme oxygenase-1 (HO-1) during cold storage and renal autograft transplantation in rabbits // Cryobiology.– 2002.– Vol.45, N4.– P. 265-266.
2. *Baust J., Van Buskirk R., Baust G.* Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis // In Vitro Dev. Biol.– Animal.– 2000.– Vol. 36, N4.– P. 262-270.
3. *Borderie V., Lopez M., Lombet A. et al.* Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.– 1998.– Vol. 39, N8.– P. 1511-1519.
4. *Burdon R.* Thermotolerance and the heat shock proteins // In: Temperature and Animal Cells. Eds. K. Bowler and B. Fuller.– Cambridge: Company of Biologists Press, 1987.– P. 113-133.
5. *Craig N.* Regulation of translation in rabbit reticulocytes and mouse L-cells; comparison of the effects of temperature // J. Cell Physiol.– 1975.– Vol.87, N2.– P. 157-166.
6. *Fujita J.* Cold shock response in mammalian cells // Microbiol. Biotechnol.– 1999.– Vol. 1.– P. 243-255.
7. *Fuller B.* Organ preservation : the profit and loss account of using hypothermia to maintain viability // Transplant Rev.– 1999.– Vol. 13.– P. 55-66.
8. *Gao D., Kerin J.* Cryopreservation and freeze-drying strategies for ovarian tissue banking // Mol. Cell. Biochem.– 1997.– Vol. 169, N1-2.– P. 1-8.
9. *Grout B.* Cryopreservation of germplasm // Cryobiology.– 1995.– Vol. 32, N3.– P. 209-220.
10. *Hochachka P., Somero G.* Biochemical adaptation.– Princeton: Princeton University Press, 1984.– 537 p.
11. *Hoffmann P., Feuerstein N., Bloch K. et al.* Cloning of the cDNA for cold shock domain protein 1 and its regulation in response to thermal stress // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 272, N1.– P. 1439-1445.
12. *Jackson M., Law R., Lamb J.* Cryopreservation of human hepatocytes // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 172-183.
13. *Jackson M., Law R., Lamb J.* Cryopreservation of human hepatocytes // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 172-183.
14. *Jackson M., Law R., Lamb J. et al.* Cryopreservation of human hepatocytes // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 172-183.
15. *Kaul S., Kaul Z., Sakamoto T. et al.* Heat shock proteins: Some new insights into old phenomena // Mol. Cell. Biochem.– 1997.– Vol. 173, N1-2.– P. 153-159.
16. *Lee C.M., Carter J.T., Alfrey E.M. et al.* Prolonged cold ischemia time obviates the benefits of 0 HLA mismatches in renal transplantation // Arch. Surg.– 2000.– Vol.135, N9.– P. 1016-1019;
17. *Lindley E.M., Jacobson J.D., Corselli J., et al.* Cryopreservation of human cumulus cells for co-cultures and assessment of DNA damage after thawing using the comet assay // J. Assist. Reprod. Genet.– 2001.– Vol. 18, N10.– P. 534-538.
18. *Liu A.Y., Bian H., Huang L.E., Lee Y.K.* Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37 degrees C in human cells // J. Biol. Chem.– 1994.– Vol. 269, N20.– P. 14768-14775.
19. *Morimoto R., Santoro M.* Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection // Nat. Biotechnol.– 1998.– Vol.16, N9.– P. 833-838.
20. *Liu K., Yang Y., Mansbridge J.* Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression // Tissue Eng.– 2000.– Vol.6, N5.– P. 539-554.
21. *Men H.L., Monson R., Parrish J.J., Rutledge J.J.* Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation // Mol. Reprod. Dev.– 2003.– Vol. 64, N2.– P. 245-250.
22. *Nishiyama H., Itoh K., Kaneko Y. et al.* A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth // J. Cell. Biol.– 1997.– Vol. 137, N4.– P. 899-908.
23. *Ohnishi T., Wang X., Ohnishi K., Takahashi A.* p53-dependent induction of WAF1 by cold shock in human glioblastoma cells // Oncogene.– 1998.– Vol. 16, N11.– P. 1507-1511.
24. *Ohsaka Y., Ohgiya S., Hoshino T., Ishizaki K.* Cold-stimulated increase in a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in human hepatoblastoma cells // DNA Cell Biol.– 2001.– Vol. 20, N10.– P. 667-673.
25. *Ota T., Hanada K., Hashimoto I.* The effect of cold stress on UVB injury in mouse skin and cultured keratinocytes // Photochem. Photobiol.– 1996.– Vol. 64, N6.– P. 984-987.
26. *Phadtare S., Alsina J., Inouye M.* Cold-shock response and cold-shock proteins // Curr. Opin. Microbiol.– 1999.– Vol. 2, N2.– P. 175-180.
27. *Punshon G., Butler P., Davidson B. et al.* Release of matrix metalloproteinases stimulated by cold preservation of human livers during transplantation // Biochem. Soc. Transac.– 2000.– Vol. 28.– P. A85.
28. *Rauen U., Polzar B., Stephen H. et al.* Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species // FASEB J.– 1999.– Vol.13.– P. 155-168.
29. *Relina L., Gulevsky A.* A possible role of molecular chaperones in cold adaptation // Cryo Letters.– 2003.– Vol. 24, N4.– P. 203-212.
30. *Roberts J.R., Rowe P.A., Demaine A.G.* Activation of NF-kappaB and MAP kinase cascades by hypothermic stress in endothelial cells // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N2.– P. 161-169.
31. *Shaddock J.G., Snawder J.E., Casciano D.A.* Cryopreservation and long-term storage of primary rat hepatocytes: effects on substrate-specific cytochrome P450-dependent activities and unscheduled DNA synthesis // Cell Biol. Toxicol.– 1993.– Vol. 9, N4.– P. 345-357.
32. *Soloff B.L., Nagle W.A., Moss A.J. et al.* Apoptosis induced by cold shock in vitro is dependent on cell growth phase // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1987.– Vol. 145, N2.– P. 876-883.
33. *Storey K.B.* Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations // Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.– 1997.– Vol. 118, N4.– P. 1115-1124.
34. *Sureshkumar G., Mutharasan R.* The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal

8. *Gregory C.D., Milner A.E.* Regulation of cell survival in Burkitt lymphoma: implications from studies of apoptosis following cold-shock treatment // Int. J. Cancer.– 1994.– Vol. 57, N3.– P. 419-426.
9. *Harding K., Staines H.* Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation // Cryo Letters.– 2001.– Vol. 22, N4.– P. 255-262.
10. *Hittel D., Storey K.B.* The translation state of differentially expressed mRNAs in the hibernating 13-lined ground squirrel (Spermophilus tridecemlineatus) // Arch. Biochem. Biophys.– 2002.– Vol. 401, N2.– P. 244-254.
11. *Holland D., Roberts S., Wood E.J., Cunliffe W.* Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes // J. Invest. Dermatol.– 1993.– Vol. 101, N2.– P. 196-199.
12. *Homma T., Iwahashi H., Komatsu Y.* Yeast gene expression during growth at low temperature // Cryobiology.– 2003.– Vol. 46, N3.– P. 230-237.
13. *Kaufman H., Mazur X., Fussenegger M., Bailey J.* Influence of low temperatures on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells // Biotechnol. Bioeng.– 1999.– Vol. 63.– P. 573-582.
14. *Kusakabe H., Szczygiel M., Whittingham D., Yanagimachi R.* Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.– 2001.– Vol. 98, N24.– P. 13501-13506.
15. *Laios E., Rebeyka I.M., Prody C.* Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes // Mol. Cell. Biochem.– 1997.– Vol.173, N1-2.– P. 153-159.
16. *Lee C.M., Carter J.T., Alfrey E.M. et al.* Prolonged cold ischemia time obviates the benefits of 0 HLA mismatches in renal transplantation // Arch. Surg.– 2000.– Vol.135, N9.– P. 1016-1019;
17. *Lindley E.M., Jacobson J.D., Corselli J. et al.* Cryopreservation of human cumulus cells for co-cultures and assessment of DNA damage after thawing using the comet assay // J. Assist. Reprod. Genet.– 2001.– Vol. 18, N10.– P. 534-538.
18. *Liu A.Y., Bian H., Huang L.E., Lee Y.K.* Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37 degrees C in human cells // J. Biol. Chem.– 1994.– Vol. 269, N20.– P. 14768-14775.
19. *Morimoto R., Santoro M.* Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection // Nat. Biotechnol.– 1998.– Vol.16, N9.– P. 833-838.
20. *Liu K., Yang Y., Mansbridge J.* Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression // Tissue Eng.– 2000.– Vol.6, N5.– P. 539-554.
21. *Men H.L., Monson R., Parrish J.J., Rutledge J.J.* Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation // Mol. Reprod. Dev.– 2003.– Vol. 64, N2.– P. 245-250.
22. *Nishiyama H., Itoh K., Kaneko Y. et al.* A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth // J. Cell. Biol.– 1997.– Vol. 137, N4.– P. 899-908.
23. *Ohnishi T., Wang X., Ohnishi K., Takahashi A.* p53-dependent induction of WAF1 by cold shock in human glioblastoma cells // Oncogene.– 1998.– Vol. 16, N11.– P. 1507-1511.
24. *Ohsaka Y., Ohgiya S., Hoshino T., Ishizaki K.* Cold-stimulated increase in a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in human hepatoblastoma cells // DNA Cell Biol.– 2001.– Vol. 20, N10.– P. 667-673.
25. *Ota T., Hanada K., Hashimoto I.* The effect of cold stress on UVB injury in mouse skin and cultured keratinocytes // Photochem. Photobiol.– 1996.– Vol. 64, N6.– P. 984-987.
antibody production // Biotechnol. Bioeng.– 1991.– Vol. 37.– P. 292-295.
35. *Taylor M., Elrifai A., Bailes J.* Hypothermia in relation to the acceptable limits of ischaemia for bloodless surgery // In Advances in Low Temperature Biology (Ed. P.L. Steponkus).– London: JAI Press, 1996.– P. 1-64.
36. *Van Rijn J, Van der Berg J, Kipp J. et al.* Effect of hypothermia on cell kinetics and response to hyperthermia and X rays // Radiat. Res.– 1985.– Vol.101, N2.– P. 292-305.
37. *Vogt S., Troitzsch D., Abdul-Kaliq H. et al.* Improved myocardial preservation with short hyperthermia prior to cold cardioplegic ischemia in immature rabbit hearts // Eur. J. Cardiothorac. Surg.– 2000.– Vol.18, N2.– P. 233-240.
38. *Watanabe I., Okada S.* Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y) // J. Cell Biol.– 1967.– Vol.32, N2.– P. 309-323.
39. *Whittingham D.* Presentation to the Society for Low Temperature Biology, 2002.
40. *Wittmers L.* Pathophysiology of cold exposure // Minn. Med.– 2001.– Vol.84, N11.– P. 30-36.

Accepted in 14.07.2004

26. *Phadtare S., Alsina J., Inouye M.* Cold-shock response and cold-shock proteins // Curr. Opin. Microbiol.– 1999.– Vol. 2, N2.– P. 175-180.
27. *Punshon G., Butler P., Davidson B. et al.* Release of matrix metalloproteinases stimulated by cold preservation of human livers during transplantation // Biochem. Soc. Transac.– 2000.– Vol. 28.– P. A85.
28. *Rauen U., Polzar B., Stephen H. et al.* Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species // FASEB J.– 1999.– Vol.13.– P. 155-168.
29. *Relina L., Gulevsky A.* A possible role of molecular chaperones in cold adaptation // Cryo Letters.– 2003.– Vol. 24, N4.– P. 203-212.
30. *Roberts J.R., Rowe P.A., Demaine A.G.* Activation of NF-kappaB and MAP kinase cascades by hypothermic stress in endothelial cells // Cryobiology.– 2002.– Vol. 44, N2.– P. 161-169.
31. *Shaddock J.G., Snawder J.E., Casciano D.A.* Cryopreservation and long-term storage of primary rat hepatocytes: effects on substrate-specific cytochrome P450-dependent activities and unscheduled DNA synthesis // Cell Biol. Toxicol.– 1993.– Vol. 9, N4.– P. 345-357.
32. *Soloff B.L., Nagle W.A., Moss A.J. et al.* Apoptosis induced by cold shock in vitro is dependent on cell growth phase // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1987.– Vol. 145, N2.– P. 876-883.
33. *Storey K.B.* Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations // Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.– 1997.– Vol. 118, N4.– P. 1115-1124.
34. *Sureshkumar G., Mutharasan R.* The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production // Biotechnol. Bioeng.– 1991.– Vol. 37.– P. 292-295.
35. *Taylor M., Elrifai A., Bailes J.* Hypothermia in relation to the acceptable limits of ischaemia for bloodless surgery // In Advances in Low Temperature Biology (Ed. P.L. Steponkus).– London: JAI Press, 1996.– P. 1-64.
36. *Van Rijn J, Van der Berg J, Kipp J et al.* Effect of hypothermia on cell kinetics and response to hyperthermia and X rays // Radiat. Res.– 1985.– Vol.101, N2.– P. 292-305.
37. *Vogt S., Troitzsch D., Abdul-Kaliq H. et al.* Improved myocardial preservation with short hyperthermia prior to cold cardioplegic ischemia in immature rabbit hearts // Eur. J. Cardiothorac. Surg.– 2000.– Vol.18, N2.– P. 233-240.
38. *Watanabe I., Okada S.* Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y) // J. Cell Biol.– 1967.– Vol.32, N2.– P. 309-323.
39. *Whittingham D.* Presentation to the Society for Low Temperature Biology, 2002.
40. *Wittmers L.* Pathophysiology of cold exposure // Minn. Med.– 2001.– Vol.84, N11.– P. 30-36.

Поступила 14.07.2004