

## Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины в Украине

В.И. Грищенко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Криобиология и криомедицина – сравнительно молодая отрасль биологии, сформировавшаяся как самостоятельная наука всего около 50 лет тому назад, предметом изучения которой является действие низких температур на объекты животного и растительного мира.

Развитию криобиологии и криомедицины способствовали фундаментальные разработки физики низких температур, а также достижения в биологии, медицине, химии, биотехнологии, криогенном машиностроении и других областях науки (академики и чл.-корреспонденты НАН Украины Б.Г. Лазарев, Б.И. Веркин, Н.С. Пушкарь, В.Г. Шахбазов, И.М. Дмитренко, В.И. Грищенко и др).

В 1972 году был создан в Украине Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН, который по структуре и научной тематике, уровню выполняемых исследований занял ведущее место среди центров того же профиля, работающих в странах мира.

Научные разработки, выполняющиеся в институте и Украине в целом, посвящены фундаментальным проблемам криоповреждения биологических объектов различного уровня организации (молекулярного, клеточного, тканевого, органного, организменного), изучению механизмов устойчивости и адаптации к холоду биологических объектов в естественных условиях, анабиоза в природе; разработке проблемы криозащиты: созданию криозащитных сред и приемов, обеспечивающих возможности обратимой остановки жизни после замораживания и хранения в искусственных условиях глубокого холода таких живых структур, жизнедеятельность которых в естественных условиях проходит при положительной температуре, а также проблемам клеточной и тканевой трансплантации, сохранения генофонда людей, редких и исчезающих видов животных и растений.

Полученные теоретические данные легли в основу создания новейших криотехнологий, элементами которой являются синтез новых криопротекторов, оригинальные способы криоконсервирования различных биообъектов, эмбриональных и фетальных тканей, экспериментальное

обоснование их клинического применения и широкомасштабное внедрение в практику лечебных учреждений Украины.

Создан единственный в Украине низкотемпературный Банк эмбриональных, плодовых и плацентарных клеток и тканей, который получил статус “Національне надбання”.

В настоящий момент успехи криобиологии тесно сопрягаются с углублением понимания принципов морфофункциональной организации, метаболических циклов, углублением процессов жизнедеятельности на основе новых идей молекулярной и клеточной биологии. Специфические черты современной криобиологии определяются приоритетным развитием исследований на уровне молекулярной и клеточной биологии, молекулярной генетики.

Познание молекулярно-клеточных (генетических, информационных, биоэнергетических, рецепторных) изменений биологических объектов их функционирования после действия низких температур (холодовой анабиоз) позволит создать новейшие криотехнологии и внедрить их для коррекции и улучшения здоровья людей и экологии в целом.

Криобиология обеспечила условия длительного хранения клеток и тканей различного происхождения. В основе достижений лежали работы многочисленных исследователей, изучавших сложную клеточную и изолированные системы, изменяющиеся под влиянием охлаждения, льдообразования и эффектов, сопровождающих эти процессы. Следует упомянуть целую плеяду ученых ИПКиК НАН Украины, благодаря которым криобиология и криомедицина заняла достойное место среди других наук. Это Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, В.И. Грищенко, В.И. Луговой, А.В. Воротилин, В.А. Моисеев, А.А. Цуцаева, Т.Н. Юрченко, Г.А. Бабийчук, Б.П. Сандомирский, А.Н. Гольцев, Е.А. Гордиенко, А.К. Гулевский, Е.Я. Панков, А.М. Утевский, М.И. Шраго, В.А. Бондаренко.

Характер изменений в биологических структурах при действии охлаждения и замораживания – основной вопрос криобиологии. Следует отметить, что общие закономерности клеточного и тканевого кристаллообразования зависят от структуры и функции их образования. На основании многочисленных широкомасштабных научных разработок были выявлены особенности метаболизма клеток и тканей раннего срока развития, степени

*Адрес для корреспонденции:* Грищенко В.И. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-43, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

дифференцировки и анатомо-топографических свойств, а также определена реакция этих клеток и тканей на замораживание и образование кристаллов льда. Тем не менее, вопрос о реакции клеток раннего этапа развития (эмбрионального, плодового) долгое время оставался недостаточно изученным, что и стало основанием для изучения институтом реакции клеток раннего этапа гистогенеза на охлаждение и криоконсервирование.

Низкотемпературное консервирование – многоэтапный и многофакторный процесс, при котором биологические объекты подвергаются действию разных физико-химических факторов, обусловленных изменениями температуры, состава и состояния компонентов системы. Ведущей тенденцией криобиологии является отказ от эмпирических принципов исследований, глубокое изучение механизмов криоповреждений и криозащиты, а также разработка на этой основе необходимых и достаточных условий эффективного низкотемпературного консервирования биообъектов.

Основная роль в реализации криоповреждений принадлежит плазматической мембране как первичной мишени криовоздействия. Под влиянием холода в плазматических мембранах происходит формирование микро- и макродефектов, размеры которых зависят от степени снижения температуры, фазово-структурных переходов липидов и уровня вымерзания воды в мембране.

Было установлено, что при развитии осмотического и температурного шока клеток факторами, контролирующими чувствительность клеток к холодному шоку, являются исходный объем и разница осмотического давления между внутри- и внеклеточной средами, а деформация упругих элементов цитоскелета при нарушении его метастабильности и осмотической дегидратации вызывает глубокое повреждение клеток.

Для защиты биологических структур при замораживании и образовании льда в мировой практике используются защитные агенты – криопротекторы.

Наличие в системе, которая подвергается замораживанию, криопротектора (некоторых солей, спиртов, сахаров, глицерина, диметилсульфоксида, полиэтиленоксида и др.), способствует повышению внутриклеточной осмолярности, что предотвращает чрезмерную потерю клеткой и тканью воды и повреждение клеточной мембраны.

Не все структурные компоненты ткани одинаково реагируют на замораживание и кристаллообразование. Изменения соединительной ткани характеризовались нарушением макромолекулярной организации межклеточного вещества, которое связано с разрушением многочисленных ионных и

водородных связей протеогликанов с гликопротеиновыми комплексами, коллагеном и эластином. Внеклеточная кристаллизация и дегидратация клеток при медленном охлаждении также являются одним из факторов криоповреждения. Вымораживание воды приводит к росту концентрации электролитов, вызывая существенную нестабильность липидо-белковых комплексов мембран клеток.

На основе проведения многофакторного анализа влияния различных скоростей охлаждения и криопротекторов различного вида и концентрации были получены клетки и ткани с высоким уровнем жизнеспособности.

Углубленные исследования клеточных суспензий в зоне низких температур позволили выявить новый механизм криоповреждения клеток – механоэлектрический, суть которого состоит в том, что при изменении температуры на границе раздела наблюдаются растрескивание кристаллической массы и появление заряда на вновь образованных кристаллах.

На основании морфологических исследований, а также симметрии и последовательности появления кристаллов льда разной величины и формы был сделан вывод, что как процесс кристаллизации, так и формы, размеры кристаллов зависят от скорости замораживания.

К основным факторам, которые повреждают клетки при замораживании, относится повышение концентрации растворимых веществ, возникающее при кристаллизации жидкой фазы вне- и внутриклеточной воды.

С помощью полученных данных была доказана роль переохлаждения в механизме криоповреждения клеток и был предложен способ управления процессом фазового перехода “вода – лед” не только для стабилизации результатов, но и для повышения сохранности клеток после замораживания – оттаивания.

Кроме того, были разработаны эффективные криопрограммы, которые обеспечили высокую жизнеспособность клеток и их компонентов, а также сохранность биологически активных веществ в высоких концентрациях и при оптимальных физиологических соотношениях.

Таким образом, в целом нами были разработаны технологические процессы, которые включают заготовку, криоконсервирование и долгосрочное сохранение клеток и тканей человека, в том числе и эмбриофетоплацентарного происхождения: эмбриональные гемопоэтические и нервные клетки, ткань раннего хориона, плаценты и ее производных, вилочковой железы, селезенки, щитовидной железы, почек, трубчатых и плоских костей, суспензии клеток фетальной печени,

хрящевой и церебральной тканей, а также тестисов плода, клеток и тканей других органов.

В Физико-техническом институте низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины (Харьков) успешно развивается экспериментальный метод низкотемпературной вторично-эмиссионной масс-спектропии, которая предназначена для молекулярно-биофизических исследований макромолекул при низких температурах. Сравнение масс-спектров растворов мономеров биополимеров (азотных оснований, аминокислот) в воде и криопротекторов позволяет выявить параметры, отображающие негативное влияние замораживания (усиление связывания ионов металлов, дегидратация, расслоение) в случае водных растворов и уменьшение этих эффектов в криозащитной среде.

В Институте животноводства УААН (г. Харьков) на протяжении многих лет проводятся исследования, направленные на оптимизацию способов низкотемпературного консервирования эмбрионов млекопитающих с использованием методов физико-математического моделирования процессов, протекающих на различных этапах криоконсервирования. Харьковская технология замораживания спермы быков-производителей известна во всем мире. В настоящее время в тесном сотрудничестве с ИПКиК НАНУ усилия коллектива этого института сосредоточены на разработке эффективных способов низкотемпературного консервирования эмбрионов сельскохозяйственных животных.

Одной из важнейших проблем криобиологии является изучение различных аспектов механизмов криозащитного действия криопротекторов, создание новых, более эффективных криоконсервантов. В ИПКиК НАН Украины в отделе криопротекторов в течение многих лет используется оригинальный подход, заключающийся в структурной модификации молекул известных криопротекторов и исследовании зависимости криозащитной активности от структуры и физико-химических свойств криопротекторов в гомологических рядах химических соединений с постепенно усложняющейся структурой. При этом реализуется следующая предпосылка – усложнение структуры молекулы криопротектора должно сопровождаться адекватным изменением его биологической активности.

В результате были получены соединения, обладающие высокой криопротекторной активностью в отношении клеток, разных по видовой принадлежности и структурно-функциональным характеристикам. В частности, были синтезированы и идентифицированы полимергомологи глицерина, метоксиэтандиола, моноэтаноламина со степенью полимеризации 1-40. Изучены физико-

химические свойства синтезированных веществ и их водных растворов, исследована их токсичность на клеточном и организменном уровне, а также криозащитная активность при криоконсервировании эритроцитов, тромбоцитов и других биологических объектов.

Следует отметить, что оксиэтилированные производные этиленгликоля (ПЭО) и глицерина (ОЭГ) способны влиять на физиологические параметры и динамику отека головного мозга теплокровных животных при их остром глубоком охлаждении, проявляя при этом противоотечное и осмодиуретическое действия, что позволяет рекомендовать эти вещества для разработки фармакологических препаратов и их использование в клинической практике.

Проведенные исследования позволили предложить подходы к целенаправленному выбору состава криопротекторов с различным механизмом их проницаемости через мембраны и криозащитного действия для криоконсервирования биологических объектов. Разработан способ криоконсервирования спермы петухов, эффективность которого проверена при долгосрочном хранении спермы разных пород (15 лет) и успешно используется в практике для сохранения генофонда и селекционирования в отечественном птицеводстве. Разработаны многокомпонентные криозащитные среды для спермы птиц и собак, позволяющие эффективно сохранять эти клетки в цикле криоконсервирования. Проведена модификация криозащитных сред для криоконсервирования меристемы картофеля и винограда методом витрификации.

В течение 30 лет ИПКиК НАНУ проводит приоритетные фундаментальные и прикладные исследования по изучению влияния низких температур и разных классов химических соединений на растения в период их активной жизнедеятельности для повышения устойчивости к воздействию неблагоприятных природных факторов (заморозки, засуха и т.д.).

Обоснованы возможность и целесообразность использования криопротекторов как веществ, повышающих устойчивость растений к низким температурам. Установлено, что особо перспективными в этом аспекте являются полиэтиленоксиды (ПЭО) с молекулярной массой 400 и 1500. Проведенные исследования позволили установить фактическое повышение резистентности к низким температурам у растений, обработанных растворами ПЭО, выявить способность последних стимулировать действие на всхожесть и ростовые качества семян многих сельскохозяйственных культур, а также сохранять качество фруктов при длительном их хранении.

В лабораторных, деляночных и полевых опытах было показано положительное действие предпосевной обработки семян различных сельскохозяйственных культур, а также внекорневой обработки вегетирующих растений растворами ПЭО. Эффективность применения предпосевной обработки семян разных сельскохозяйственных культур была подтверждена в хозяйствах разных климатических зон Украины.

Полученные данные послужили основанием для разработки сочетаний ПЭО с другими компонентами, одновременного использования смеси ПЭО различной молекулярной массы, создания технологий их применения.

В результате были созданы комплексные синтетические препараты для предпосевной обработки семян и внекорневой обработки вегетирующих растений с уникальными свойствами криопротектора, регулятора роста, адаптогена, протравителя, фунгицида. Одним из эффективных препаратов, разработанных в последнее время, является «Дорсай». Предполагается, что действие препарата «Дорсай» при обработке семян проявляется в предпосевном активировании в них обменных процессов, стимуляции процесса и энергии прорастания семян, что связано с мобилизацией запасных веществ и положительно влияет на полевую всхожесть семян и растений, дальнейший их рост и развитие, повышение адаптационных возможностей. «Дорсай» экологически безопасен, безвреден для человека и животных, почвы и водных источников.

Аналогов подобных препаратов в мире не существует. Препарат прошел государственные испытания в разных климатических зонах Украины, получен 20-летний патент Украины. «Дорсай» включен в перечень препаратов, применение которых разрешено на территории Украины.

Эмбриональные ткани - богатый источник региональных стволовых клеток, изучение которых является перспективным направлением современной клеточной биологии и экспериментальной медицины.

Установлено, что в эмбриональных препаратах содержатся эмбрио-специфические ростовые факторы, цитокины и большое количество сигнальных макромолекул, которые в эмбриогенезе выполняют роль индукторов ростовых и регенерационных процессов. В эмбриональных препаратах содержатся стадиоспецифические белки и низкотемпературные пептиды, в том числе а-фетопротейн, изменяющие интенсивность апоптоза; антиоксиданты, адаптогены, противовоспалительные бактериостатические соединения, интерлейкины, стимулирующие иммуногенез. Этими свойствами клеток объясняется их высокая

эффективность при лечении.

Особое внимание в работе отводится изучению стволовых кроветворных клеток (СКК), полученных на ранних стадиях развития эмбриона, обладающих высокой способностью к самообновлению, более высоким пролиферативным потенциалом, а также они незначительно отторгаются иммунной системой реципиента.

Фенотипический анализ клеток эмбриональной печени эмбрионов 6-12-недельного возраста показал, что основная популяция представлена клетками-предшественниками эритроидного ряда разной степени коммитированности (гликофорин А+ положительные клетки). Значительную часть клеток суспензии составляют претенденты на стволовые кроветворные клетки – CD 34 и АСС 133 положительные клетки. Кроме гемопоэтических клеток, первичная суспензия КЭП содержит до 10% гепатобластов – общих предшественников гепатоцитов и билиарных клеток. Раздельное определение жизнеспособности криоконсервированных клеток специфического фенотипа показало, что стволовые кроветворные клетки (АСС 133+, CD 34+) оказались более чувствительными к криоконсервированию, чем более дифференцированные (CD 45+, гликофорин А+). Это подчеркивает актуальность и необходимость изучения фундаментальных криобиологических характеристик стволовых клеток.

Исследования, проведенные на КЭП, позволили разработать основные подходы к проблеме замораживания клеточных суспензий и установить закономерности при их замораживании. Эксперименты с применением методов математического моделирования выявили взаимное влияние отдельных параметров процесса криоконсервирования. Так, при замораживании с медленной скоростью до точки кристаллизации были выявлены повреждения, которые развиваются не вследствие внутриклеточной кристаллизации, а в результате начального переохлаждения и приводят к гибели клеток-предшественников.

Установлено, что изученные объекты в определенной степени отличаются по своей реакции на холод от клеток, полученных у взрослого организма, поскольку имеют несколько отличный тип метаболизма и уровень дифференциации, хотя основные принципы действия замораживания остались прежними.

Эмбриональные препараты в большинстве своем включают целый коктейль региональных стволовых клеток. Так эмбриональная печень содержит стволовые клетки крови, печеночной паренхимы (гепатоциты), кровеносных сосудов и желчных протоков. Дифференцировка и пролиферация этих клеток в условиях организма

проходит быстро и без побочных эффектов. Даже трансплантация криоконсервированных эмбриональных клеток крысам с острой печеночной недостаточностью, вызванной гепатэктомией, приводит к быстрой регенерации печени, которая сопровождается восстановлением детоксикационной функции.

Проведенное изучение влияния суммарной суспензии криоконсервированных клеток фетальной печени человека на функциональное состояние регенерирующей печени крыс после 70%-й гепатэктомии позволяет реализовать два независимых эффекта этих клеток: 1 – стимуляция регенерации печени, 2 – стимуляция эритропоэза.

Инсульты, травмы головного и спинного мозга составляют большую группу заболеваний, при которых применение нейротрансплантаций дает обнадеживающие результаты.

Разработан метод получения и криоконсервирования нейрональной ткани эмбриона человека, а также проведена большая экспериментальная работа по изучению морфогенеза приживления деконсервированных клеток, морфологических и биохимических аспектов восстановительного периода после их введения.

Введение эмбриональных нервных клеток способствовало повышению уровня дофамина, что может быть доказательством приживления трансплантата и установления интеграционных связей с дофаминэргическими структурами головного мозга.

Применение аллогенной эмбриональной нервной ткани поддерживает содержание нейромедиаторов, норадреналина, дофамина и ГАМК. Следует отметить коррекцию количества нейромедиаторов не только в месте их введения, но и в отдаленных участках мозга, что указывает на генерализованное трофическое действие препарата на мозг в целом.

На экспериментальных моделях аллоксанового диабета и антиоксидант-дефицитного атеросклероза показано, что введение криоконсервированных клеток эмбриональной печени значительно снижает степень гликемии и приводит к нормализации процессов перекисидации с обновлением физиологического равновесия между степенью активности свободнорадикальных процессов и адекватной стимуляцией антиоксидантных механизмов.

Использование таких криоконсервированных клеток не только ликвидирует гиперхолестеринемию и гипертриглицеридемию, но также активирует антиатерогенные механизмы защиты, то есть обратный транспорт холестерина за счет повышения фракции липопротеидов высокой плотности. Экспериментальные исследования

показывают высокую эффективность влияния криоконсервированных клеток эмбриональной печени на метаболические нарушения.

Также нами впервые показано выраженное влияние криоконсервированной суспензии эмбриональной печени на состояние коагуляционного и фибринолитического звена гемостаза. Полученные данные могут быть использованы для применения клеточной суспензии в общем комплексе лечения и при других сосудистых заболеваниях (инфарктах, инсультах).

Пациент при использовании тканевых и клеточных препаратов получает ряд биологически активных, сбалансированных соединений естественного происхождения, способных повлиять на разные звенья метаболизма целостного организма, а также прогениторные клетки, выполняющие заместительные функции.

Серией экспериментов были установлены биологические эффекты влияния криопрепаратов на органы и системы лабораторных животных разных возрастных групп, а также при моделировании некоторых видов патологии.

Так, применение криоконсервированного фрагмента плаценты у экспериментальных животных стимулирует активную секреторную функцию надпочечной железы. В ткани печени при этом обнаружено усиление физиологической регенерации с повышением количества двуядерных гепатоцитов и накоплением в них гликогена. В периферическом органе иммунной системы – селезенке – отмечено увеличение количества фолликулов и герминативных центров в строме. Были определены биологические эффекты влияния криоматериала на органы и системы лабораторных животных разных возрастных групп, а также при моделировании некоторых видов патологии.

Выявлено, что использование криоплаценты животным с печеночной и почечной недостаточностью потенцирует репаративные процессы в стромальных и паренхиматозных элементах, в результате чего восстанавливаются трофическая, синтетическая и дезинтоксикационная функции этих органов.

Наиболее показательно влияние плацентарной ткани на репродуктивную систему реципиента. Применение криоконсервированной плаценты вызывает стимуляцию созревания яйцеклеток и сперматогенеза, у беременных животных увеличиваются масса плодов и количество жизнеспособного потомства.

У беременных самок лабораторных животных выявлено улучшение маточно-плацентарной гемодинамики. Отмечено положительное влияние такой трансплантации на сперматогенез при некоторых формах патоспермии.

Одним из перспективных методов коррекции андрогенной недостаточности и лечения патологии мужской репродуктивной системы является трансплантация фетальных семенников. На основе физических, морфологических и культуральных исследований семенников плодов разработан метод их криоконсервирования, который обеспечивает максимальное сохранение их биологических качеств.

После функциональной нагрузки у животных, которым вводилась плацента, параметры электрокардиограммы характеризовались незначительными изменениями. Усиление метаболических процессов в миокарде старых животных находит отражение в нормализации электрофизиологических показателей возбудимости и проводимости сердечной мышцы.

На моделях экспериментально вызванных гепатитов аутоиммунного и токсического генеза отмечен положительный эффект применения плодового тимуса на процессы регенерации гепатоцитов и повышение их детоксикационной функции, а также гиперпластические процессы в тимусе реципиента с активацией лимфоцитопоза и снижением аутосенсбилизации.

После введения деконсервированной плаценты морфологическое исследование плаценты рожениц показало ряд существенных особенностей, которые можно объединить под названием «омоложение плаценты».

Исследование ряда гормональных показателей у женщин, которым вводилась плацента, показало, что уровень прогестерона и эстрадиола в периферической крови возрастал, при этом эндокринные, вазомоторные нейро-психические показатели практически нормализовались в течение первого месяца, без развития каких-либо побочных реакций.

Интенсивные работы по изучению биологии стволовых клеток ведутся в центре регенеративной медицины (г. Киев), предложена оригинальная концепция стволовых пространств и их роли в механизмах старения и долголетия.

Под стволовыми пространствами авторы понимают пул стволовых клеток, призванных восполнять клеточные потери разнообразных тканей с целью восстановления организма, т.е. обновление клеточного состава всех тканей и органов за счет стволовых пространств. С этих позиций рассматривается возможность продления жизни и омоложения.

Исследования, касающиеся изучения свойств эмбриональных, стволовых клеток, их культивирования и трансплантации, проводят в Институте неотложной и восстановительной хирургии АМН Украины (г. Донецк) под руко-

водством Папандопуло А.Г., где выращиваются эквиваленты дермы, состоящие из эмбриональных фибробластов в коллагеновом геле либо фибробластов пациента в геле и используют для лечения ожогов и язв; в Национальном медицинском институте им. Богомольца (г. Киев) под руководством Смикодуба А.И. и Новицкой А.В. ими проводится лечение больных сахарным диабетом эмбриональными клеточными суспензиями. В Институте нейрохирургии им. Ромоданова (г. Киев) совместно с учеными нашего института осуществляется культивирование эмбриональных нервных клеток *in vitro*; в Институте молекулярной биологии и генетики (г. Киев) под руководством А.В. Ельской используются клеточные и тканевые препараты при ожоговой болезни, а также в Одесском государственном медицинском университете под руководством В.Н. Запорожана проводятся большие экспериментальные работы по изучению биологии стволовых клеток.

В последнее время альтернативным источником гемопоэтических стволовых клеток-предшественников (CD34<sup>+</sup>) все чаще выступает кордовая кровь, которая, как было показано многими авторами, содержит гораздо большую часть некоммутированных гемопоэтических клеток, чем взрослый костный мозг. Более того, гемопоэтические стволовые клетки-предшественники из кордовой крови обладают большим потенциалом пролиферации и экспансии, чем их аналоги из взрослого костного мозга. Поэтому гемоплацентарная терапия может стать в дальнейшем доминантной. Такая терапия включает как внутривенные переливания концентрата ядродержащих клеток, обогащенных гемопоэтическими стволовыми клетками, так и использование цельной кордовой крови, в которой содержится большое количество эритроцитов, ядродержащих клеток, в том числе и гемопоэтических стволовых клеток, а также биологически активных веществ плазмы кордовой крови.

Попытки использовать кордовую кровь вместо костного мозга были предприняты в 80-х годах XX века. Первая трансплантация гемопоэтических клеток, при которой была использована кордовая кровь вместо костного мозга, была произведена в 1988 году. В результате восстановлена гемопоэтическая система ребенка с анемией Фанкони после трансплантации кордовой крови от его новорожденной сестры. С тех пор интерес к использованию кордовой крови больным значительно возрос. На сегодняшний день по всему миру выполнено более 3000 больным успешных трансплантаций кордовой крови с различными гематологическими и генетическими заболеваниями.

Во всем мире создано множество банков кордовой крови для широкого ее клинического применения, в частности, в США существует около 30 банков кордовой крови, которые объединены в общую сеть. В рамках Европейского сообщества создана объединенная сеть банков кордовой крови под общим названием EUROCORD. В России также ведется работа по созданию банков кордовой крови.

Поэтому создание банка кордовой крови в Украине является очень актуальной проблемой, тем более что в нашей стране имеется многолетний опыт работы по данной проблеме. Этими вопросами на протяжении многих лет занимаются такие ведущие институты, как Киевский институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины и др. Ученые нашего института занимаются разработкой новых уникальных технологий криоконсервирования клеточных суспензий.

В настоящее время во всем мире наиболее широко используемыми методами для криоконсервирования клеточных суспензий являются методы с применением таких непроникающих криопротекторов, как ДМСО, глицерин и др. Однако применение этих криопротекторов обуславливает необходимость их удаления после размораживания клеток. Это существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания.

Поэтому наиболее перспективным направлением криоконсервирования клеточных суспензий является разработка безотмывочных методов криоконсервирования с использованием непроникающих в клетку криопротекторов.

Однако, несмотря на многочисленные попытки применения непроникающих криопротекторов для криоконсервирования клеточных суспензий, механизм их действия до сих пор во многом остается неясным, а их использование очень часто оказывается мало эффективным.

В связи с этим были проведены исследования механизмов температурно-осмотической стабилизации клеток к действию непроникающих криопротекторов и низких температур. На модели эритроцитов человека установлено, что важная роль в механизмах стабилизации клеток к действию факторов криоконсервирования принадлежит белкам цитоскелета клеток, модификация которых приводит к повышению устойчивости эритроцитов к действию факторов замораживания при условии их холодной экспозиции в растворах криопротектора ПЭО-1500. Показано, что направленность структурной модификации плазма-

тических мембран и белков цитоскелета клеток определяется влиянием температуры и уровнем дегидратации под действием непроникающего криопротектора на системы, регулирующие их структурно-функциональное состояние. Это связано с изменениями концентрации внутриклеточного кальция и уровнем фосфорилирования белков. Стабилизация структурно-функционального состояния белков цитоскелета под влиянием холодной инкубации клеток с криопротектором сопровождается повышением уровня фосфорилирования спектрина и концентрации в нуклеоцитоплазматическом кальция – процессов, которые поддерживают белки в полимерном состоянии.

На основании этих фундаментальных исследований обоснованы новые подходы для направленной модификации структурно-функционального состояния клеток на начальных этапах перед криоконсервированием с целью повышения их устойчивости к замораживанию-отогреву. Разработаны оптимальные условия для структурной стабилизации эритроцитов, заключающиеся в предварительной холодной инкубации клеток и дозированном введении криопротектора. На основании принципа «холодовой» стабилизации разработан безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой непроникающего криопротектора ПЭО-1500, который позволяет в значительной степени повысить устойчивость клеток к замораживанию-отогреву и сохранить их структурно-функциональные показатели на достаточно высоком уровне.

Применение новых подходов позволило нам разработать безотмывочный метод криоконсервирования цельной кордовой крови, основанный на применении непроникающего криопротектора ПЭО-1500 в сочетании с «холодовой» обработкой клеток перед замораживанием и специальной двухэтапной программой замораживания, который обеспечивает высокую сохранность одновременно в препарате двух типов клеток (эритроцитов, ядросодержащих клеток, в том числе гемопоэтических) и биологически активных веществ плазмы кордовой крови.

При этом исследования ядросодержащих клеток (CD45<sup>+</sup>) кордовой крови, в том числе и гемопоэтических (CD34<sup>+</sup>), до и после криоконсервирования были проведены самым современным методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur с использованием реагентов Becton Dickinson по международному ISHAGE протоколу. Эти исследования свидетельствуют о том, что разработанный метод криоконсервирования цельной кордовой крови позволяет сохранять до 90% CD34<sup>+</sup>-клеток после размораживания.

Нами также разработан безотмывочный метод криоконсервирования концентрата ядросодержащих клеток, выделенных из кордовой крови человека, с использованием криопротектора ПЭО-1500, «холодовой» обработки клеток и специально разработанной для ядросодержащих клеток двухэтапной программе. Данный метод позволяет сохранять после размораживания до 85% CD34<sup>+</sup>-клеток.

В институте создан препарат «Гемокорд», представляющий собой взвесь ядерных клеток пуповинной крови в аутологичной плазме. Разработаны новые оригинальные методы его получения, подготовки к консервированию и криоконсервированию.

В экспериментальных исследованиях и при клинической апробации методов лечения с использованием предложенного криоконсервированного материала эмбрионального, плацентарного и плодового происхождения нами были выявлены механизмы специфического и неспецифического влияния на организм реципиента, которые заключались в выраженном заместительном эффекте и стимуляции репаративных возможностей организма, выравнивании его гомеостаза за счет активации нервной, иммунной и эндокринной систем.

Многофакторное влияние введенных клеток на организм реципиента определяет широкий перечень нозологических форм заболеваний, при котором лечение может быть эффективным.

Эти клетки и ткани с успехом применяются для восстановления кроветворения, при иммунодефицитах, хронической панцитопении, аплазии тимуса, серповидно-клеточной анемии, мизогенной и лимфобластической анемиях, при угнетении кроветворения в результате радиационно обусловленной патологии органов кроветворения, цитостатической болезни и ряде других показаний.

Использование фетальных клеток в лечении сосудистой патологии органа зрения позволяет улучшить и стабилизировать зрительные функции, приостановить прогрессирование заболеваний, вызвать регресс вторичных геморрагических осложнений.

Разработка современных технологий криоконсервирования, а также соблюдение требований относительно безопасности материала для его использования в соответствии с положениями Европейской Ассоциации тканевых банков позволили Банку биологических объектов института получить статус Национального достояния Украины.

В последние годы в медицине активно развивается перспективное направление по использованию культивированных клеток эмбрионального

происхождения в качестве заместительной и стимулирующей терапии, которые уже находят применение в лечении ожоговой патологии, длительно незаживающих повреждениях кожи, косметологической практике.

Исследования в нашем институте были направлены на получение перевиваемых культур из различных органов эмбрионов человека. Основной акцент в исследованиях сделан на изучение характеристик культивируемых *in vitro* линий клеток фибробластоподобной морфологии мезенхимального происхождения. Клетки культивировали как в монослойной культуре, так и на различных носителях. Культуры исследовались морфологически, изучались их культуральные свойства, плоидность. При изучении иммунотипа культивируемых клеток обнаружено, что CD34<sup>+</sup> экспрессируется на эмбриональных фибробластах и по мере увеличения сроков культивирования возрастает количество положительных по этому признаку клеток.

Полученные экспериментальные данные *in vitro* позволили перейти к изучению функциональной значимости криоконсервированного материала в системе *in vitro*. Проведены эксперименты на животных по изучению влияния клеток диплоидных линий и культуры клеток хориона при лечении ожоговой болезни.

Установлено, что различные способы медленного замораживания оказывают неравноценное влияние на выживаемость доимплантационных эмбрионов человека. Обоснован оптимальный метод криоконсервирования, позволяющий получить высокую сохранность доимплантационных эмбрионов человека.

Глубоко исследованы морфофункциональные характеристики эмбрионов человека, находящихся на разных стадиях развития, и определен оптимальный срок развития и морфологические параметры эмбрионов для криоконсервирования. Впервые изучена скорость морфогенеза эмбрионов человека после криоконсервирования. При этом выявлено, что определение жизнеспособности, основанная только на морфологической оценке и темпах дробления *in vitro*, является недостаточной, поскольку не учитывает влияния факторов криоконсервирования на их генетический аппарат. Поэтому для объективизации оценки необходимо проведение цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, позволяющих выявить генетическую полноценность криоконсервированных эмбрионов.

Новым в работе является изучение вклада отцовского и материнского геномов в частоту хромосомной нестабильности доимплантационных эмбрионов.



Показана эффективность аутологического сокультивирования с биологически активными жидкостями и клетками кумулюса и гранулезы для повышения жизнеспособности деконсервированных эмбрионов человека.

Строгая морфологическая оценка деконсервированных эмбрионов, изучение скорости морфогенеза и генетический анализ деконсервированных эмбрионов позволяет использовать для эмбриопереноса только полноценные эмбрионы. Поэтому предложенные методики могут быть применены в лечебных учреждениях, которые занимаются лечением методами вспомогательных репродуктивных технологий, а также в научно-исследовательских институтах, изучающих онтогенез доимплантационных эмбрионов.

Вопросы применения охлаждения для оздоровления и лечения человека являются предметом интенсивных исследований в Японии, США, Великобритании и Германии. Авария на ЧАЭС и сохраняющаяся неблагоприятная экологическая ситуация в Украине, вызванная увеличением зоны радиации и интенсификацией промышленной деятельности, поставили ряд нерешенных проблем перед здравоохранением и, в первую очередь, создание нетрадиционных подходов к лечебным мероприятиям неотложной и отсроченной врачебной помощи. Проведенные нами исследования по действию искусственного охлаждения на организм дали возможность по-новому оценить и интерпретировать механизмы действия холода, оптимизировать целесообразность глубины и длительности холодового воздействия.

Результаты исследований функций охлажденного мозга являются предпосылкой для создания в кратчайшие сроки не имеющих в мире аналогов патогенетически обоснованных методов лечения ряда заболеваний ЦНС, обусловленных функциональной недостаточностью нейромедиаторных систем головного мозга, к которым относятся, прежде всего, наиболее часто встречающиеся болезненные состояния, объединенные под названием гипоталамический синдром. Полученные данные показывают, что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является одним из важных звеньев в цепи нейрофизиологических процессов, обеспечивающих гомеостаз организма в условиях пониженной жизнедеятельности.

Известно, что целый ряд медикаментов, в том числе антибиотиков, нейромедиаторов, гормонов и других биологически активных веществ не проникают в структуры мозга из-за наличия ГЭБ. Впервые в ИПКиК НАН Украины на основе фундаментальных исследований функций охлажденного мозга показана возможность управлять гематоэнцефалическим барьером. Так как

гипотермия не имеет специфических противопоказаний, характерных для медикаментозных средств, а также позволяет резко сокращать дозы препаратов или вовсе отказаться от их использования, то у врачей появляется возможность быть независимыми от фармакологического обеспечения и создаются предпосылки для использования метода охлаждения на раннем этапе заболевания, что в комплексе обеспечит высокий социальный эффект.

Проведенные в ИПКиК исследования показали, что использование ритмических холодовых воздействий (РХВ) в диапазоне резонансных явлений сенсорных рецепторов биологической системы сопровождается функциональной перестройкой жизненно важных структур головного мозга, изменением функции ГЭБ, как и при воздействии традиционных методов локальной гипотермии. Однако достигаемый эффект при воздействии РХВ не требует снижения температуры, поэтому сопровождается меньшими энергетическими затратами биологической системы, не вызывает стрессовых эффектов.

Впервые получены данные, показывающие, что осуществление РХВ, сочетающегося с индивидуальными особенностями вегетативных и терморегуляторных реакций организма, многократно повышает эффективность процедуры. При этом повышение проницаемости ГЭБ сопровождается состоянием долговременной потенциации структур центральной нервной системы, что отображается в сверхмедленных биоэлектрических процессах, проявляясь в активном восстановлении функций мышления и памяти.

Метод практически не имеет противопоказаний к применению в условиях поликлиники и стационаров, простота и доступность позволяет использовать его на всех стадиях развития патологического процесса.

Развитие криогенных технологий за последние 30 лет значительно повысило интерес практической медицины к терапевтическому использованию также и сверхнизких температур. Широко представленные на конгрессах и в литературе клинические наблюдения специалистов лишь усилили интерес к практическому созданию различных конструкций и камер для криотерапии. Но сугубо научных данных, относительно структуры нейро- и биохимических реакций целостного организма на экстремальное общее охлаждение в разные температурные и временные интервалы практически нет. Отсутствие адекватной техники и научного обоснования действия экстремальной криотерапии продолжает сдерживать прикладные и фундаментальные исследования, поэтому так и не определены роль и место криотерапии в

современной медицине, что оставляет ее «экзотическим» методом лечения, несмотря на его уникальные возможности.

Проведенные в ИПКиК НАН Украины эксперименты определили направленность дальнейших теоретических, и практических и конструкторских исследований. Впервые в Украине смонтирована уникальная, не имеющая аналогов в СНГ, криокамера для экстремального низкотемпературного воздействия на организм человека. Увеличен температурный диапазон влияния путем выделения в камере трех отсеков с температурой  $-10$ ,  $-20$ ,  $-60$ ,  $-120^{\circ}\text{C}$ .

Использование терапевтических возможностей криокамеры не исключает, а в ряде случаев требует применения прежде разработанных в ИПКиК методов лечебной гипотермии. Исследование искусственного охлаждения организма человека по особым программам, а также создание на этой основе средств управления основными функциями жизнедеятельности открывает перспективу для разработки и внедрения принципиально новых технологий лечения целого ряда заболеваний путем влияния на центры нервной системы.

Имеются оригинальные научно-технические разработки и ноу-хау относительно создания новых методов экстремальной криотерапии с целью регулирования функционального состояния ГЭБ и других функциональных систем головного мозга, а также не имеющих аналогов неинвазивных методов контроля нейромедиаторных процессов в ЦНС. Продолжение фундаментальных исследований по изучению нейробиологических механизмов функционирования ГЭБ при экстремальном охлаждении позволит разработать новые и повысить эффективность существующих методов интенсивной криотерапии.

Представленными данными далеко не исчерпывается проблема изучения эмбриональных клеток и тканей. В институте запланированы диссертационные работы для соискателей; тематика, касающаяся исследования различных аспектов получения, замораживания, определения жизнеспособности клеток и тканей эмбрионального происхождения, разрабатывается многими отделами института. Получены чрезвычайно интересные данные о возможности направленного управления ростом и дифференциацией клеток, выделенных из костного мозга взрослых доноров, о формировании при культивировании этими клетками нейробластов, мезенхимальных и некоторых других клеток.