Возможная роль моноксида углерода в повреждении ишемией-реперфузией и холодовом хранении

К.Дж. Грин
Институт медицинских исследований Нортвик Парк, г. Лондон, Великобритания

A Possible Role for Carbon Monoxide in Ischaemia-Reperfusion Injury and Cold Preservation

C.J. Green
Northwick Park Insitute for Medical Research, London, United Kingdom

За последнее десятилетие мы исследовали роль высококонсервативного фермента гемоксигеназы-1 (ГО-1) во многих патологических состояниях, включая повреждение ишемией-реперфузией, воспаление и бактериальное инфицирование. В ответ на инсульт, равно как и с помощью модуляции такими веществами, как куркумин и моноксид углерода (CO), происходит существенная стимуляция ГО-1. Мы разработали молекулы, высвобождающие CO (CORMS), которые при использовании на модельных животных оказались мощными противовоспалительными, противоапоптотическими и антибактериальными средствами. Их потенциальная роль в холодовом хранении тканей и органов будет обсуждаться в докладе.

Over the past decade, we have been investigating the role of a highly conserved enzyme haemoxygenase-1 (HO-1) in many pathological conditions including ischaemia-reperfusion injury, inflammation and bacterial infections. HO-1 is highly inducible both in response to insult and by modulation through agents such as curcumins and carbon monoxide (CO). We have developed CO-releasing molecules (CORMS) which in animal models are shown to be powerful anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-bacterial agents. Their potential role in cold storage of tissues and organs will be discussed.

Биосохранение – уменьшение отрицательных последствий консервирования на молекулярном уровне

Дж. Г. Бауст[1], Дж. М. Бауст[1,2], К. Шнайдер[1,2], Р. Ван Баскирк[1,2]
[1]Институт Биомедицинской Технологии, Государственный Университет Нью-Йорка, г. Бингхемтон, США
[2]Служба сохранения клеток, г. Овего, США

Biopreservation – Molecular-based Mitigation of the Preservation Challenges

J.G. Baust[1], J.M. Baust[1,2] , K. Snyder[1,2], R. VanBuskirk[1,2]
[1] Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, NY
[2]Cell Preservation Services, Inc. Owego, NY

Криоконсервирование имеет долгую и успешную историю. В 1949 г. были опубликованы сообщения о криоконсервировании спермы птиц и быков. В настоящее время знания и умения в криоконсервировании клеток стали значительными и привели к широкому внедрению их в академические, клинические и сельскохозяйственные сферы применения. Многие клеточные системы сейчас успешно криоконсервируют, однако попрежнему остается значительным количество погибших клеток, связанное с криоконсервированием. Более того, некоторые клеточные системы до сих пор невозможно криоконсервировать с точки зрения практических перспектив, что связано с разнообразием ответных реакций на стресс-факторы, возникающие в процессе замораживания-оттаивания. В 1985 г. Jurisicova и соавт. сообщили об участии программируемой клеточной смерти в гибели предымплантационного эмбриона, последовавшей за криоконсервированием. В 1998 г. несколько независимых групп ученых сообщили об участии многих типов клеточной смерти в случаях с неудавшимся криоконсервированием, включая апоптоз и некроз [Baust и соавт., Bodderie и соавт., 1998]. Существует достаточное количество сообщений, описывающих управление клеточной смертью посредством различных ингибиторов протеаз, свободно-радикальных ловушек, состава среды и т.д. Эти исследователи выявили различные молекулярные ответные реакции клеток на криоконсервирование и затем показали значительное улучшение выживаемости клеток посредством управления молекулярными событиями. Несмотря на то, что в многочисленных исследованиях сообщается о молекулярных основах индуцируемой криоконсервированием отсроченной клеточной смерти, наше понимание вовлеченных в этот процесс специфических путей и немедленного ответа на уменьшение их отрицательного воздействия остается на ранней стадии. Данный доклад представляет обзор современных знаний о механизмах клеточной смерти, ответственной за неудачное криоконсервирование, точках запуска, путях передачи сигналов и управлении ними – все что может способствовать выживаемости клеток и что несомненно является важным следующим шагом в эволюции криобиологической науки.

The field of cryopreservation has a long and successful history dating to the first published reports on the cryopreservation of bovine and avian spermatozoa in 1949. Since that time, advances in our knowledge base and our ability to cryopreserve cells have been significant and have led to its widespread integration into academic, clinical and agricultural settings. While many cell systems are successfully cryopreserved today, there remains a significant degree of cell death associated with cryopreservation and moreover, some cell systems remain uncryopreservable from a practical perspective. This is due largely to the diversity of post-freeze responses of individual cells to the various stressors experienced during the freeze-thaw process. In 1995, Jurisicova, *et al*. reported on the involvement of programmed cell death in pre-implantation embryo demise following cryopreservation. In 1998, several independent groups reported on the involvement of multiple modes of cell death linked to cryopreservation failure including apoptosis and necrosis [Baust, *et al*., 1998 and Borderie, *et al*., 1998]. In addition to those reports, there are a substantial number of reports describing the modulation of cell death through the use of various protease inhibitors, free radical scavengers, media formulations, etc. These studies have identified diverse molecular-based, cellular responses to cryopreservation and have further demonstrated the significant improvement in cell survival through the modulation of molecular events. While numerous studies have reported on the molecular-based phenomena of cryopreservation-induced delayed-onset cell death, our understanding of the specific pathways involved and the immediate downstream effect of their mitigation remains in its infancy. This presentation will provide an overview of our current knowledge on the mechanisms of cell death associated with cryopreservation failure, initiation points, signal transduction pathways, and their modulation which have been shown to benefit cell survival and are proving to be a critical next-step in the evolution of the cryopreservation sciences.

Терапевтическая гипотермия в реаниматологии: прошлое, настоящее, будущее

Л.В. Усенко, А.В. Царев
Днепропетровская государственная медицинская академия

Therapeutic Hypothermia in Critical Care Medicine: Past, Present, Future

L.V. Usenko, A.V. Tsarev
Dnepropetrovsk State Medical Academy, Ukraine

Фундаментальной проблемой реаниматологии является разработка методов восстановления функций головного мозга после перенесенной ишемии и последующей реперфузии. Глубина, а соответственно и тяжесть ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга у больных с травматическим и нетравматическим повреждением головного мозга увеличиваются при повышении температуры тела на 0,5°С или более 37°С. В этой связи мягкая терапевтическая гипотермия (ТГ) (32–34°С) рассматривается как наиболее многообещающий физический метод нейропротекторной защиты головного мозга.

Выделяют следующие механизмы нейропротекторного действия ТГ:

– ингибирование деструктивных энзиматических реакций (на 1,5% при снижении температуры ядра на 1^0C);

– супрессия свободнорадикальных реакций;

– протекция пластичности липопротеинов цитоплазматических мембран;

– снижение потребления кислорода в регионах головного мозга с низким кровотоком;

– улучшение доставки кислорода в ишемические зоны головного мозга и снижение внутричерепного давления;

– снижение внутриклеточного лактатацидоза;

– ингибирование биосинтеза и продукции эксайтотоксичных нейротрансмиттеров [Alzaga A.G. et al., 2006; Safar P., Kochanek P.M., 2002; Smith T.L., Bleck T.P., 2002].

В настоящее время изучается влияние мягкой ТГ на восстановление неврологического статуса у коматозных больных с черепно-мозговой травмой, индуцируемой поверхностным методом охлаждения с помощью гипотерма CSZ “Blanketrol II”. Определяются оптимальная продолжительность ТГ, уровень температуры ядра, скорость охлаждения и согревания тела.

Fundamental task of critical care medicine is the development of the methods recovering the brain functions after previous ischemia and following reperfusion. The depth and, correspondingly, severity of ischemic-reperfusion damage in the patients with traumatic and non-traumatic brain impairments increase with the rise in body temperature by 0.5°C or higher than 37°C. In this connection a mild therapeutic hypothermia (TH) (32–34°C) is considered as the most promising physical neuroprotective method of brain.

The following mechanisms of neuroprotective effect of TH may be defined:

– inhibiting of destructive enzyme reactions (by 1.5% at nucleus temperature reduction by 1°C);

– suppression of free radical reactions;

– protection of plasticity of lipoproteins of cytoplasm membranes;

– reduction of oxygen consumption in brain regions with low blood circulation;

– improvement of oxygen deliver into ischemic zones of brain and reduction of intracranial pressure;

– reduction of intracellular lactacidemia

– inhibition of biosynthesis and production of excitotoxic neurotransmitters [Alzaga A.G. et al., 2006; Safar P., Kochanek P.M., 2002; Smith T.L., Bleck T.P., 2002].

Now the effect of mild TH on recovery of neurological status in comatose patients with cranial-brain traumas induced with cooling surface method using hypotherm CSZ “Blanketrol II” is under study. Optimal duration of TH, the nucleus temperature level, cooling rate and body warming were determined.

Некоторые подходы к криоконсервированию региональных стволовых клеток

А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, Н.Г. Скоробогатова, Н.А. Горохова, В.П. Грищук
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Some Approaches to Cryopreservation of Regional Stem Cells

A.Yu. Petrenko, Yu. A. Petrenko, N.G. Skorobogatova, N.A. Gorokhova, V.P. Grischuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Экспериментальные исследования региональных стволовых клеток (РСК) свидетельствуют о перспективности их использования в регенеративной медицине для восстановления функции органов и тканей, утраченной или подавленной в результате наследственной или приобретенной патологии. В связи с этим разработка и усовершенствование методов криоконсервирования, создание низкотемпературных банков этих клеток позволят обеспечить запас тестированного и сертифицированного материала для трансплантации пациентам.

В докладе обобщен опыт авторов по криоконсервированию первичных и субкультивированных суспензий региональных стволовых клеток плодов и взрослого человека.

Для повышения эффективности криоконсервирования РСК на основе медленного программного замораживания использовали несколько подходов: математическое моделирование отдельных этапов криоконсервирования, модификацию состава криозащитных сред и сред отмывки клеток от криопротектора, инициацию кристаллообразования на этапе охлаждения.

Показано, что включение в состав криозащитных сред, содержащих ДМСО, таких непроникающих соединений, как сахароза или высокомолекулярный полиэтиленгликоль (ПЭГ-8000), позволяет повысить эффективность криоконсервирования, снизить концентрацию проникающего криопротектора и исключить иммуногенные компоненты, в частности сыворотку.

Сравнительное изучение влияния криоконсервирования на свойства первичных и субкультивированных суспензий РСК свидетельствует о более высокой чувствительности свежевыделенных клеток к переохлаждению, развивающемуся на этапе замораживания.

С учетом перспективности использования РСК в биоинженерных конструкциях тканей и биогибридных органах, технология криоконсервирования которых должна исключать кристаллизацию раствора, приведены результаты экспериментов по разработке витрификационных сред, способов их введения и удаления, токсичности и эффективности.

Приведенные в работе данные свидетельствуют о том, что конечный результат криоконсервирования региональных стволовых клеток во многом определяется выбором использованного подхода, зависит от источника клеток и их исходного состояния (жизнеспособности, культивирования).

Experimental researches of regional stem cells (RSCs) testify to the perspective of their application in regenerative medicine for the recovery of organ and tissues function, lost or arrested as the result of inherent or gained pathology. Therefore the development and modernization of cryopreservation methods, establishing of low temperature banks of these cells enable to provide the reserve of tested and certified material for transplantation of patients.

In the paper the experience of the authors in cryopreservation of initial and sub-cultured suspensions of regional stem cells of fetuses and adults is summarised.

For increasing the efficiency of RSCs cryopreservation based on slow program freezing some approaches were used: mathematical modeling of isolated stages of cryopreservation, modification of content cryoprotective media and the ones of cell washing out of cryoprotectant, initiation of crystal formation at cooling stage. It has been shown that inclusion in to the content of cryoprotective media, containing DMSO, of nonpenetrating compounds such as sucrose or highmolecular polyethylene glycol (PEG-8000), enables to increase the cryopreservation efficiency, reduces the concentration of penetrating cryoprotectant and excludes immunogenic components, especially serum.

Comparative study of cryopreservation effect on properties of initial and sub-cultured suspensions of RSCs testifies to higher sensitivity of freshly-isolated cells to supercooling, developing at freezing stage.

Due to RSCs application perspective in bioengineered constructions of tissues and biohybrid organs, which cryopreservation technology must exclude solution crystallization, the results of experiments for developing of vitrification media, methods of their injection and extraction, toxicity and efficiency are shown.

The data shown in the work testify to the final result of cryopreservation of regional stem cells is mainly determined with selection of used approach, dependence on cell source and their initial state (viability, culturing).

Создание новых форм иммунологически совместимых трансплантатов, получаемых из пупочного канатика

А.А. Исаев, А.А. Приходько, С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова, И.В. Потапов,
И.Н. Сабурина, Н.И. Новикова , В.С. Мелихова
Институт стволовых клеток человека, г. Москва

Creation of New Forms of Immunologically Compatible Grafts, Derived from Umbilical Cord

A.A. Isaev, A.A. Prikhodko, S.L., Kiselev, M.A. Lagarkova, I.V. Potapov,
I.N. Saburina, N.I. Novikova, V.S. Melikhova
Institute of Human Stem Cells, Moscow, Russia

Проблемы отторжения, иммуносупрессии, подбора иммуносовместимых тканей и органов для трансплантации являются важнейшими в современной трансплантологии. В последнее время идет активный поиск новых источников биоматериала, применение которых позволит преодолеть эти ограничения. Одним из многообещающих подходов является трансплантация аутологичных клеток, поэтому в настоящее время все большее внимание уделяется вопросам банкирования и хранения аутологичных клеток и тканей. Например, гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови, заготавливаемые при рождении ребенка, применяются в качестве аутологичных трансплантатов для успешного лечения более 50 заболеваний, среди которых различные формы лейкозов, иммунодефициты и пр.

Пупочный канатик является структурой, в которой содержатся клетки мезенхимального происхождения, например фибробласты, эндотелиальные клетки пупочной вены (HUVEC). Известно, что фибробласты могут применяться в лечении ожогов, рубцовых дефектов кожи, а HUVEC благодаря их высокому пролиферативному потенциалу – для реваскуляризации ишемизированных тканей. Поэтому разработка протоколов выделения, культуральной экспансии и банкирования этих клеточных популяций представляется важным шагом на пути к разработке новых аутологичных, иммунологически совместимых трансплантатов для клинического применения.

Нами разработан метод последовательного выделения, культивирования и криохранения двух типов клеток из одного и того же образца пупочного канатика: HUVEC и фибробластоподобных клеток пупочного канатика.

Полученные культуры состояли из пластик-адгезивных клеток диплоидного кариотипа с высокой пролиферативной активностью, прослеженной в течение 4-6 пассажей. Фибробластоподобные клетки экспрессировали виментин, коллаген 1 и 4 типов, альфа-актин, не экспрессировали CD45, CD11b, CD14, обладали низкой экспрессией антигенов гистосовместимости. HUVEC при культивировании имели характерный для эндотелиоцитов фенотип, экспрессировали фактор фон Виллебранда и формировали тубулярные структуры. Выделенные типы клеток были подвергнуты длительному криоконсервированию и разморозке с сохранением морфофункциональных свойств.

Таким образом, предлагаемый нами метод последовательного выделения позволяет получать и сохранять два дополнительных типа клеток из одного образца пупочного канатика (при этом не препятствуя традиционному банкированию пуповинной крови). Полученные клетки могут применяться для лечения различных заболеваний в рамках аутотрансплантации, расширяя возможности банков персонального хранения и так называемой «биологической страховки».

The problems of rejection, immune suppression and selection of immune compatible tissues and organs for transplantation are the basic ones in contemporary transplantology. Recently there has been an active search of new sources of biomaterial, application of which will enable to overcome these limitations. One of the most promising approaches is the transplantation of autologous cells, therefore nowadays more and more attention is paid to the tasks of banking and storage of autologous cells and tissues. For instance, hemopoietic stem cells of cord blood procured during the birth of a child are applied as autologous grafts for successful treatment of more than 50 diseases, among those are various forms of leucoses, immune deficient states *etc*.

Umbilical cord is the structure where the cells of mesenchymal origin are comprised, e.g. fibroblasts, endothelial cells of umbilical vein (HUVEC). It is known that fibroblasts may be used for treating burns, scar skin defects, and HUVEC due to their high proliferative potential can be applied for revascularization of the tissue underwent the ischemia. Therefore the designing of the protocols of isolation, cultural expansion and banking of these cell populations is an important step on the way to the developing of new autologous, immunologically compatible grafts for clinical application.

We have developed the method of sequential isolation, culturing and cryostorage of two cell types from the same sample of umbilical cord: HUVEC and fibroblast-like cells of umbilical cord.

The obtained cultures comprised the plastic-adhesive cells of diploid karyotype with a high proliferative activity, traced for 4-6 passages. Fibrolast-like cells expressed vimentin, collagen of the 1st and 4th types, alpha-actin, and did not express CD45, CD11b, CD14, possessed low expression of histocompatibility antigens. HUVEC during culturing had the characteristic for endotheliocytes phenotype, expressed the von Willerbrand factor and formed tubular structures. Isolated cell types were subjected to long-term cryopreservation and thawing with preserving morphofunctional properties.

Thus the proposed by us method of sequential isolation enables to obtain and preserve two additional cell types from one sample of umbilical cord (herewith with no preventing to the banking of cord blood). The obtained cells may be applied for treating different diseases within the frames of autotransplantation with extending the possibilities of personal storage and so-called “biological insurance”.