

Achievements in Cryobiology and Cryomedicine for National Health

Криобиология и криомедицина – сравнительно молодые отрасли науки, оформившиеся как самостоятельные дисциплины во второй половине XX века. Предметом их изучения является действие низких температур на живые объекты животного и растительного мира.

В 1928 году при Украинском физико-техническом институте (г. Харьков) была создана криогенная лаборатория и начаты первые исследования по изучению влияния холода на биологические объекты (Л.В. Шальников).

Становление криобиологии и криомедицины основывалось на фундаментальных разработках в области физики низких температур, а также на открытии новых явлений и процессов в биологии, медицине, химии, биотехнологиях, криогенном машиностроении и других отраслях науки (Б.Г. Лазарев, Б.И. Веркин, Н.С. Пушкарь, В.И. Грищенко и др.).

Развитию нового направления способствовало также создание в Харькове Физико-технического института низких температур и на его базе лаборатории, а в 1972 году – Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины с самостоятельными целями и задачами.

С начала создания институт по научной тематике, уровню выполняемых исследований занял ведущее место среди научных центров аналогичного профиля других стран.

Полученные научные результаты легли в основу создания таких новейших криотехнологий, как методы криохирургии, синтез новых эффективных криопротекторов, оригинальные способы криоконсервирования различных биообъектов, в том числе эмбриональных и фетальных тканей, а также экспериментальное обоснование их клинического применения и широкомасштабное внедрение в практику лечебных учреждений Украины.

В институте были разработаны методические подходы к оплодотворению вне организма и полу-

чены первые дети “из пробирки” (В.И. Грищенко и сотр.). Разработанный в институте способ сверхбыстрого замораживания спермы и эмбрионов человека запатентован в США, Англии, Франции, Германии, Японии. С нашим участием впервые в Украине родились дети из замороженных эмбрионов.

В институте сформировалось несколько научных школ, которые получили широкое отечественное и международное признание. Ряд исследований не имеют аналогов в мировой науке.

В 1998 г. на базе института под эгидой ЮНЕСКО была создана единственная в мире Международная кафедра криобиологии и криомедицины.

На основе результатов фундаментальных исследований института были выполнены прикладные разработки в области биотехнологии, медицины, ветеринарии, сельского хозяйства, пищевой и микробиологической промышленности.

Для сокращения сроков их внедрения на базе института был создан Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук, Академии медицинских наук и Министерства охраны здоровья Украины.

Научные разработки института проводятся по фундаментальным проблемам: выявление механизмов криоповреждения биологических объектов на различных уровнях организации (молекулярном, клеточном, тканевом, органном, организменном); изучение механизмов устойчивости и адаптации к холоду биологических объектов в естественных условиях анабиоза в природе; создание криозащитных сред и приемов, обеспечивающих возможность обратимой остановки жизни; проблемы клеточной и тканевой трансплантации и терапии; сохранение генофонда человека, редких и исчезающих видов животных и растений.

В настоящее время успехи криобиологии как науки тесно связаны с углублением понимания принципов морфофункциональной организации живого, метаболических циклов, процессов жизне-

деятельности систем на основе новых идей молекулярной и клеточной биологии. Специфика современной криобиологии определяется приоритетными исследованиями на уровне молекулярной и клеточной биологии, молекулярной генетики.

Познание молекулярно-клеточных изменений биологических объектов, их функционирования после действия низких температур позволяет создать новейшие криотехнологии и внедрить в здравоохранение новые методы улучшения здоровья людей, экологии в целом.

Криобиология обеспечила длительное хранение клеток и тканей различного происхождения. Характер изменений в биологических структурах разного срока развития при действии охлаждения и замораживания – основной вопрос криобиологии. В результате многочисленных широкомасштабных научных разработок были выявлены особенности метаболизма клеток и тканей в зависимости от степени дифференцировки и анатомогеографических свойств, а также определена их реакция на замораживание и образование кристаллов льда.

Однако вопрос о реакции клеток раннего гистогенеза (эмбрионального, плодового) на охлаждение и криоконсервирование долгое время оставался недостаточно изученным, что и стало основанием для дальнейших исследований, проводимых институтом.

Низкотемпературное консервирование – многоэтапный и многофакторный процесс, при котором биологические объекты подвергаются действию разных физико-химических факторов, обусловленных изменениями температуры, состава и состояния компонентов системы. Современной тенденцией развития криобиологии является отказ от эмпирических принципов исследования, 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.

Была доказана роль переохлаждения в механизме криоповреждения клеток и предложен способ управления процессом фазового перехода “вода-лед” для повышения сохранности клеток после замораживания-оттаивания.

Кроме того, были разработаны программы криоконсервирования, которые обеспечили высокую жизнеспособность клеток и их компонентов,

а также сохранность биологически активных веществ в высоких концентрациях и оптимальных физиологических соотношениях.

Началом этих исследований было изучение состояния клеток крови и костного мозга человека, что и явилось основой для организации Банков крови.

Институт разработал криобиотехнологии, которые включают заготовку, криоконсервирование и долгосрочное хранение клеток и тканей, в том числе эмбриофетоплацентарного происхождения: эмбриональных гемопоэтических и нервных клеток, ткани 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 половых желез, клеток и тканей других органов.

Изучение фундаментальных проблем криобиологии имело большое практическое значение для медицины, поскольку позволяло повысить эффективность лечения ряда патологических процессов, в том числе не поддающихся традиционным методам лечения.

Использование лечебного действия холода на организм невозможно без углубленного понимания явлений и процессов, которые происходят в охлаждаемых и замораживаемых клетках и тканях, в связи с чем теоретические исследования приобрели особое значение.

Исследование патофизиологических, биохимических, морфологических и иммунологических процессов на клеточном, тканевом и организменном уровнях позволило научно обосновать применение криохирургии, криотерапии и гипотермии в медицинской практике, а также обеспечить развитие нового направления современной медико-биологической науки – исследования стволовых клеток, ряда фетальных клеток и тканей, а также их потенциальных возможностей для медицины.

Использование эмбриональных клеток и тканей в лечебных целях имеет многолетнюю историю, однако их применение было сопряжено с опасностью заражения пациента инфицированным материалом. Хранение клеток и тканей в гипотермических условиях приводило к резкому снижению жизнеспособности сохраняемых объектов.

Таким образом, криобиология сделала возможным безопасное применение эмбриональных, фетальных и других тканей и клеток, а наш институт стал лидером в разработке холодových методов их хранения и лечебного применения.

На основе разработанных нами и внедренных в практику технологий долгосрочного хранения созданы условия для тщательной проверки биологического материала на ряд инфекций, что обеспечивает безопасность пациента, а также позволяет

при необходимости оказывать быструю медицинскую помощь, особенно в экстремальных ситуациях.

Приоритет института в разработке способов хранения и использования криоконсервированных объектов неоспорим. Это подтверждено многочисленными патентами.

В настоящее время во всем мире ведутся интенсивные научно-исследовательские работы по изучению стволовых клеток, интерес к которым вызван их способностью к неограниченному самообновлению и образованию всех типов дифференцированных клеток в организме. С терапевтическим применением этих клеток связывают надежды на прорыв в лечении онкологических, гематологических, неврологических и других заболеваний.

Использование стволовых клеток открывает неограниченные перспективы трансплантологии, вплоть до создания новых органов.

Ведутся интенсивные научно-исследовательские работы по созданию новых методов лечения на основе заместительной клеточной терапии с использованием стволовых клеток.

О возможности превращения эмбриональных клеток в любой вид тканей эмбриологам известно давно, однако впечатляющие результаты связаны с феноменом репродуктивного и терапевтического клонирования клеток эмбрионов человека. Клеточные технологии – это относительно молодая отрасль биологии и медицины, в основе развития которой были первые переливания крови, использование костного мозга для лечения аплазий кроветворения, создание методов искусственного осеменения, оплодотворения в пробирке и др.

Параллельно с бурным развитием биологии стволовых клеток изучаются механизмы регенерации тканей с использованием этих клеток, поскольку регенеративная биология составляет основу саногенеза и трансплантологии. В настоящее время во всех областях медицины отрабатываются экспериментальные и клинические подходы в клеточной трансплантологии и тканевой инженерии.

Однако остается еще большое количество неясных вопросов, решение которых является первостепенной и сложной задачей.

В настоящее время в Украине наблюдаются резкое увеличение числа и тяжести заболеваний иммунного, нейро- и эндокринного происхождения, болезней систем кроветворения и обмена веществ, снижение демографических показателей.

Недостаточная эффективность применяемых традиционных методов лечения, перегруженность терапевтических программ медикаментозными средствами, развитие устойчивых к ним форм заболеваний обусловили поиск альтернативных

методов лечения, в частности применение криоконсервированных препаратов фетального происхождения.

По мнению ведущих ученых в ближайшее время клеточные технологии будут безальтернативным методом лечения многих тяжелых заболеваний.

Развитие клеточной и тканевой терапии, которая относится к области репаративной медицины, сдерживается вследствие несовершенства не только законодательства Украины, но и ряда других стран. В странах, где существует государственная поддержка методов лечения с использованием фетального материала, наблюдается тенденция к интенсификации исследований по этой тематике.

В результате длительной исследовательской работы по изучению закономерностей действия холода, причин криоповреждений в биологических объектах и возможностей их защиты обеспечен приоритет института и были получены значимые результаты по длительному сохранению суспензионных и плотных тканей.

Медико-биологические исследования проводятся как на фрагментах органов и тканей, так и на клеточных суспензиях.

Более 20 лет объектом многочисленных исследований сотрудников института являются стволовые клетки из различных источников: эмбрионов, тканей взрослого организма, а также кордовой крови и плодовых тканей.

Особое место в клеточной и тканевой терапии занимают стволовые кроветворные клетки плодов и пуповинной крови человека, а также клетки и ткани фетоплацентарного комплекса.

Итогом длительных исследований сотрудников института была разработка методов криоконсервирования биологических объектов с сохранением их структурных и функциональных показателей. Установлено, что сохранность клеток плодовой печени при криоконсервировании зависит от сроков гестации и фенотипа клеток. Доказано, что клетки более раннего срока развития более устойчивы к факторам криоконсервирования.

Функциональная полноценность клеток после отогрева подтверждена дополнительными экспериментальными данными – достоверным снижением гипергликемии у крыс с экспериментальным диабетом и восстановление детоксикационной функции печени у крыс с моделированной острой и хронической печеночной недостаточностью.

В институте проведены исследования нейрональных клеток плодовых тканей и доказана эффективность их применения при экспериментальном аутоиммунном энцефалите. Получены положительные результаты применения аутологичных

нейрональных клеток при тяжелой неврологической патологии.

Высокая востребованность препаратов кордовой крови в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток определила необходимость создания Банков кордовой крови во многих странах мира (E. Gluckman). Сотрудниками нашего института при непосредственном участии проф. S. Sumida был разработан эффективный безотмывочный метод криоконсервирования кордовой крови, который позволил получить высокую сохранность жизнеспособных стволовых гемопоэтических клеток. Методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что после криоконсервирования сохранность CD45⁺-клеток составила 85% и CD34⁺-клеток – 98%. Разработанные методы криоконсервирования явились основой для создания препарата аутологичной кордовой крови “Стемкорд-ауто”, запасы которого хранятся в криобанке. В институте был разработан препарат аллогенной кордовой крови “Гемокорд”, применяющийся для лечения различных видов патологии. В настоящее время изучается способность этого препарата успешно оказывать противовирусное действие при гриппозной инфекции.

Созданы лечебные препараты, разрешенные МОЗ Украины для широкого применения (“Криоцелл”, “Платекс”).

Институтом проводится работа общегосударственного значения – создание в Украине Низкотемпературных банков аллогенной и аутологичной крови, что обеспечивается как научными разработками, так и аппаратным оснащением, созданным в конструкторском бюро института.

Использование в медицинской практике препаратов, представляющих собой сложную многокомпонентную систему биологических макромолекул (экстракты тканей, сыворотка кордовой крови), и необходимость длительного сохранения их биологических качеств обусловили применение низкотемпературного хранения с подбором соответствующих параметров криоконсервирования.

Проведенные нами исследования сыворотки кордовой крови и экстракта плаценты с помощью гель-хроматографии, ЭПР-спиновых зондов, дифференциальной сканирующей калориметрии показали, что воздействие низких температур при неконтролируемом охлаждении сопровождается изменением конформации макромолекул и значительной модификацией их динамической структуры, что свидетельствует об агрегации белковых компонентов. Изучение влияния режимов охлаждения для сохранения исходных параметров таких сложных растворов свидетельствует о необходимости использования высоких скоростей замораживания при температуре хранения –80 и –196°С.

На основании полученных результатов были созданы технологии сублимационного высушивания экстракта плаценты и сыворотки кордовой крови при полном сохранении в них гормонов и некоторых биологически активных веществ.

Учитывая высокое содержание в сыворотке кордовой крови биологически активных веществ, в институте были изучены свойства некоторых ее фракций. Исследование биологической активности низкомолекулярной фракции криогемолизата сыворотки кордовой крови показало эффективность ее использования в качестве ранозаживляющего средства. При этом отмечены ускоренное уменьшение площади ожоговых ран, нормализация клинических показателей (содержание общего гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов) и стимуляция процессов регенерации в области раны.

В последние годы во многих работах описан метаболический “профиль” плацентарной ткани и, как следствие этого, наблюдается активное использование в медицине ее биологически активных веществ.

В институте разработана технология криоконсервации фрагментов плаценты человека. При введении криоконсервированной ткани плаценты в организм пациента поступает комплекс клеток, продуцирующих гормоны, цито- и интерлейкины, ферменты и другие вещества, что способствует процессам репарации, повышению устойчивости к гипоксии, оказывает выраженное стимулирующее действие на органы и системы реципиентов.

Клиническая апробация подтвердила высокую терапевтическую эффективность введения криоплаценты при лечении фетоплацентарной недостаточности, невынашивании беременности, сахарном диабете и его осложнениях, бесплодии мужском и женском, патологическом климаксе. Наиболее выраженное влияние криоконсервированная ткань плаценты оказывает на репродуктивную систему. Показатели уровня гормонов гипофизарно-яичниковой системы у женщин в перименопаузе до и после применения криоплаценты свидетельствуют о нормализации уровня гормонов после лечения.

В ряде случаев были отмечены снижение артериального давления у гипертоников, ослабление болевых проявлений при ревматизме, полиартрите, нормализация вегетосудистых показателей.

Практика борьбы с атеросклерозом имеет многолетнюю историю, однако до настоящего времени применение фармакологических препаратов далеко не всегда сопровождается обратным развитием структурных изменений, которые являются причиной многообразной патологии.

В нашем институте исследовалось применение криоконсервированной суспензии клеток фетальной печени для лечения атеросклероза в эксперименте.

При проведении клинических испытаний было показано, что препарат нашего производства, криоконсервированный экстракт плаценты, эффективен в лечении стенокардии. Получены данные об использовании криоконсервированной ткани плаценты при развитии атеросклеротического процессе, в медицинской литературе такие сведения отсутствуют.

Сотрудниками института показано, что введение криоконсервированной плацентарной ткани экспериментальным животным приводит к регрессу атероматозных бляшек в стенке аорты. Образование при этом мощной сети *vasa vasorum* предотвращает развитие стадии кальциноза и сопровождается неоваскуляризацией миокарда, восстановлением структурно-функциональной целостности эндотелия аорты. В целом применение такого препарата оказывает ярко выраженный гиполипидемический, вазотрофический и вазопротекторный эффекты.

Применение холода в медицине не ограничено лишь его способностью тормозить обменные процессы в клетках.

Исследование физиологических процессов при общем охлаждении организма с помощью электрофизиологических, биохимических методов способствовало разработке новых немедикаментозных методов коррекции патологических состояний, в первую очередь нарушений деятельности центральной нервной системы.

Кратковременное воздействие низких температур (экстремальная криотерапия) вызывает повышение мощности спектра биоэлектрической активности сердца как в сверхнизком, так и в низком диапазоне частот, при этом изменения носят обратимый характер с быстрым возвращением к норме. Установлено, что периодическое экстремальное криовоздействие в криокамере (-120°C) повышает способность организма к адаптации через активацию внутриклеточных метаболических и транспортных процессов, что приводит к уменьшению деструктивных процессов в миокарде старых экспериментальных животных. Проведенные фундаментальные исследования привели к созданию метода коррекции нарушенных вегетативных функций у людей пожилого возраста, что подтверждено многочисленными патентами. В настоящее время совместно с Харьковским национальным медицинским университетом продолжаются клинические испытания этого метода для лечения других видов патологии.

Кроме того, низкие температуры обладают свойством разрушать ткани за счет образования кристаллов льда и осмотических явлений, что используется для разрушения некоторых опухолей, лечения таких тяжелых состояний, как цирроз пе-

чени и др. (Е.И. Кандель, Г.В. Бондарь, Н.И. Корпан, D.J. Baust). Наши экспериментальные исследования показали, что сочетание криогепатодеструкции с введением криоэкстрактов печени и селезенки способствует восстановлению печеночной паренхимы. Усиленный лечебный эффект установлен при комбинации криогепатодеструкции с денервацией печеночной артерии.

В течение многих лет в институте проводятся исследования по криоаблативному лечению доброкачественных и злокачественных новообразований, получены положительные клинические результаты.

Сводные данные об использовании криодеструкции в абдоминальной онкологии, при злокачественных опухолях были представлены на соискание Государственной премии Украины в области науки и техники.

В институте проводятся фундаментальные и прикладные исследования в области криопатофизиологии, в частности по идентификации раковых стволовых клеток. Установлена прямая связь криочувствительности этих клеток с развитием опухолевого процесса, что определяет объем и время криоаблативного хирургического вмешательства.

В последние годы значительно возрос интерес к использованию клеточных технологий в медицинской практике, в частности возможность локального и системного введения культивированных клеточных линий. Это открывает перспективы для лечения различных нозологий, в том числе таких тяжелых, как сердечно-сосудистые заболевания (А.Г. Попандупуло).

Основной акцент в наших исследованиях сделан на изучение характеристик культивируемых *in vitro* клеток мезенхимального происхождения, полученных из различных источников. Клетки культивировали как в монослойной культуре, так и на различных носителях.

В институте проводятся перспективные разработки по созданию тканеинженерных конструкций. В настоящее время исследованы особенности поведения стромальных клеток при культивировании на микроволокнах углеродного материала. Установлено, что при этом клетки продуцируют экстрацеллюлярный матрикс, необходимый для формирования тканеподобного окружения.

Культивирование плодовых нейроклеток является самостоятельной и достаточно сложной задачей. Полученные в институте в ходе экспериментальной работы результаты показывают, что в начале процесса культивирования образуются нейросферы, идентифицированные антителами к бета-тубулину, из которых нейроклетки выходят в среду и формируют клеточные сети. В результате

изучения метаболического потенциала нейро-клеток был создан препарат “Гемонейронал”, который успешно применяется при лечении тяжелой офтальмологической патологии.

Совместно с сотрудниками Института травматологии и ортопедии АМН Украины (г. Киев) проводятся исследования, направленные на создание хрящевой ткани на основе аутологичных стромальных клеток пациента путем индукции хондрогенной дифференцировки в культуре на альгинатных микроносителях.

Благодаря использованию нанотехнологий в наших исследованиях, совместно с Институтом монокристаллов НАН Украины (г. Харьков) был достигнут новый уровень знаний и получены данные с высоким уровнем достоверности.

В медицинской практике, где применение культивируемого биоматериала является ситуацией выбора и может выполняться в плановом порядке, перспективно использование и культивирование аутологичных мезенхимальных клеток. В институте разработана технология криоконсервирования, обеспечивающая сохранение морфофункциональных свойств таких клеток в культуре, их клоногенный рост, способность к самоподдержанию и наличию высокого пролиферативного потенциала со стабильным иммунофенотипом, характерным для мезенхимальных клеток этого типа.

Исходя из успешного применения культивированных клеток для лечения эндокринной недостаточности, в институте проводится работа по разработке методов их долгосрочного холодового хранения.

Предложены способы криоконсервирования культуры адренокортикальной ткани, органотипической культуры щитовидной железы, семен-

ников. Большое внимание уделяется разработке способов пролонгирования выживаемости эндокринных трансплантатов при иммуноизоляции и комбинированной трансплантации.

Проводимая в ИПКиК работа по криосохранению различных дрожжей и дрожжеподобных грибов преследует цель создания антимикотических препаратов и средств специфической профилактики кандидозов.

Для обеспечения полноценного хранения коллекций биологического материала в институте функционирует первый в Украине Низкотемпературный банк биологических объектов, которому присвоен статус Национального достояния. В нем проводится большая научно-исследовательская работа по изучению температурных полей низкотемпературных хранилищ и разрабатываются методологии сохранения материала в парах жидкого азота.

Достижения в низкотемпературном консервировании некоторых тканей и клеток и позитивных результатов доклинических исследований признаны Координационным Центром трансплантации органов, тканей и клеток Украины. Получено разрешение на клиническое испытание ряда биологических объектов в качестве трансплантационного материала.

Успешная работа сотрудников института отмечена 5 Государственными премиями в области науки и техники СССР и Украины.

Важнейшая и приоритетная задача института – участие в программах, направленных на улучшение здоровья нации.

Поступила 28.08.2008