

ИПКиК НАН Украины: история, настоящее, будущее

А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine: History, Present, Future

A.N. GOLTSEV

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

В представленном докладе освещены этапы развития ИПКиК НАН Украины со времени его основания в 1972 году и до настоящих дней, затронуты вопросы перспектив института. Акцентируется внимание на судьбоносной встрече в начале 70-х годов XX века двух неординарных людей – Б.Е. Веркина и Н.С. Пушкаря, которая фактически предопределила создание абсолютно уникального учреждения. Большое внимание этой инициативе, всесторонняя поддержка на самых трудных начальных этапах ее реализации были оказаны Президентом НАН Украины Б.Е. Патеном.

Отмечается, что со времени основания институт был и остается единственным научным учреждением в СССР, Украине и мире, осуществляющим комплексные фундаментальные и прикладные работы в области медицины, ветеринарии, сельского хозяйства, биотехнологий, микробиологической промышленности и т. д. Начиная свою деятельность в составе 47 человек и 6 научных отделов, за 40 лет численность сотрудников института выросла до 341 и 15 отделов. Научные направления исследований были заложены их основателями, к которым можно отнести таких «классиков» криобиологии и криомедицины, как Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, А.А. Цуцаева, В.А. Моисеев, М.Г. Шенберг, Б.М. Даценко, В.М. Чередниченко, Ю.А. Иткин, В.И. Митасов и др. До настоящего времени стратегически важными остаются такие научные направления, как исследование механизмов криоконсервирования и криозащиты биологических объектов, создание эффективных криопротекторов, использование холода в медицине, разработка технических средств и аппаратуры для его применения в клинической практике и криоконсервирования биологических объектов.

Особое внимание в докладе уделяется одному из важных этапов развития института с 1983 по 2011 годы, когда им руководил академик НАН Украины В.И. Грищенко. Человек широчайшей эрудиции, который генерировал массу идей, часть которых нам еще только предстоит воплотить в жизнь. Подчеркивается значимость сформулированного и сформированного им еще в начале 80-х годов XX века направления, именуемого как «криобиология стволовой клетки», остающегося и сейчас стержневым направлением научных и прикладных работ нашего института.

В докладе также сфокусировано внимание на работе и достижениях отделов и института в целом на современном этапе его развития, обсуждаются вопросы перспективных исследований, затрагиваются темы, имеющие отношение к научно-организационной работе института, работе кафедры ЮНЕСКО, а также научного и практического взаимодействия с МНЦ НАН, АМН и МОЗ Украины и ряд других вопросов.

The report presents the developmental stages of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine since its foundation in 1972 to the present day, the prospects of the institute are specified. It is focused to the fateful meeting at the beginning of the 70s of the twentieth century of two very extraordinary people – B. Ye. Verkin and N. S. Pushkar, who actually determined the creation of totally unique institution. Great understanding of the initiative, wholehearted support of the most difficult initial stages of its implementation was provided by the President of the National Academy of Sciences of Ukraine B. Ye. Paton.

It is noted that since its establishment the institute was and has remained the only research institution in the USSR, Ukraine and the world, performing comprehensive fundamental and applied research in the field of medicine, veterinary medicine, agriculture, biotechnology, microbiological industry, etc. Starting its activity from 47 persons and six academic departments, during 40 years the Institute has grown to 341 persons and 15 departments. Scientific research areas were established by their founders, including such 'classics' of cryobiology and cryomedicine as N. S. Pushkar, A. M. Belous, A. A. Tsutsayeva, V. A. Moiseyev, M. G. Shenberg, B. M. Datsenko, V. M. Cherednichenko, Yu. A. Itkin, V. I. Mitasov and others. Till now there have been remained the strategically important research areas such as the study of cryopreservation and cryoprotection mechanisms of biological objects, effective cryoprotectants, the use of cold in medicine, the development of technical apparatuses and equipment to be applied in clinical practice and for cryopreservation of biological objects.

Special attention is paid to one of the most important stages in the development of the Institute since 1983 to 2011, when it was headed by the academician of the National Academy of Sciences of Ukraine V. I. Grishchenko. The man of great learning, who generated a lot of ideas, some of those we have yet to implement in future. There is emphasized the importance of posed and shaped by him in the early 80s of XX century the direction, referred to as 'stem cell cryobiology' being even now for our institute the core of fundamental and applied researches.

The report also focuses the attention to the work and achievements of the departments and institution as a whole at the present stage of its development, and discusses future researches to be performed. The issues related to scientific and organizational work of the Institute, the activity of the UNESCO Chair, scientific and practical cooperation with the Interdepartmental Scientific Center of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences and the Ministry of Health of Ukraine and a number of other issues are under discussion.

Процедура криоабляции: сдвиг фазы апоптоза и криосенсибилизация

Дж.Дж. БАУСТ

Институт Биомедицинской Технологии, Университет, штат Нью-Йорк, Бингхэмтон, США

Cryoablation: Apoptotic Phase Shifting and Cryo-Sensitization

J.G. BAUST

Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, NY, USA

Расширение применения термотерапии требует четкого понимания механизмов, с помощью которых низкие температуры разрушают ткани-мишени, тем самым давая еще один шанс на жизнь при лечении раковых поражений.

Расшифровка биохимических ответных реакций клеток на воздействие низких температур имеет важнейшее значение для постоянного улучшения эффективности лечения. С этой целью изучение «отложенного» начала гибели клеток позволило управлять клеточными реакциями посредством регуляции апоптотических путей. Мы предположили, что кроме явлений «отложенного» апоптоза, происходящих, как показано, в результате воздействия температур несколько ниже точки замерзания (10 до -25°C), в клетках, подвергшихся воздействию сверхнизких температур ($< -30^{\circ}\text{C}$), может наблюдаться даже более быстрое наступление апоптоза.

Клетки рака предстательной железы человека были подвергнуты воздействию температур от -60 , -30 , и -15°C для моделирования процедуры криоабляции. Используя проточную цитометрию, флуоресцентную микроскопию и анализ western blot, образцы были детально исследованы в разное время после оттаивания для определения стрессорных путей, вовлеченных в гибель клетки. Результаты показывают, что при сверхнизких температурах (ниже -30°C) значительная часть клеток подверглась запрограммированной смерти в течение всего лишь 30 мин после оттаивания, достигая максимума $\sim 40\%$ через 90 мин, а через 6 ч после размораживания наблюдались только некротические клетки. Однако при более высоких температурах ниже точки замерзания (выше -30°C), активация и прогрессирование апоптоза происходят более замедленно и не отмечаются до 6–24 ч после оттаивания. Уровни апоптоза были также значительно ниже: $\sim 10\%$ клеток, подвергающихся апоптозу, к 6 ч после оттаивания в результате воздействия температуры -15°C и до $\sim 25\%$ к 6 ч после оттаивания клеток, охлажденных до -30°C . Кроме того, было установлено, что раннее начало апоптоза запускалось посредством мембраноопосредованного каспазависимого механизма (внешнего), в то время как «отложенный» апоптоз вовлекал как внешние, так и внутренние (митохондриальные) пути. Эти данные свидетельствуют о влиянии апоптотического континуума, через который более сильный криогенный стресс активирует внешние, мембрано регулируемые апоптотические пути, в то время как менее «жесткое» замораживание активирует внутренние, митохондриально-опосредованные пути. Быстрая индукция и развитие апоптоза при сверхнизких температурах объясняют, почему ранее не были получены такие результаты после замораживания как в условиях криоабляции, так и криоконсервирования. В конечном счете наша цель – расшифровать события и сигнальные пути, которые специфически вовлечены в запуск быстрого наступления апоптоза. Как только это станет известно, криохирургические процедуры могут быть модифицированы таким образом, чтобы можно было выборочно индуцировать быстрое наступление апоптоза или задерживать гибель клеток для повышения общей эффективности криоабляции. Будут представлены первые доказательства того, что выбор криосенсибилизаторов позволяет повысить криочувствительность.

The expanding application of thermal therapies necessitates a clear understanding of the mechanisms by which low temperature destroys targeted tissue thereby yielding a viable option in the treatment of cancerous lesions. Critical to the continual improvement of treatment efficacy is deciphering the biochemical responses of cells to low temperature exposure. To that end, the identification of delayed onset cell death has allowed for the manipulation of cellular responses through the regulation of apoptotic pathways. We have hypothesized that in addition to delayed apoptotic events that have been shown to occur following exposure to mild sub-freezing temperatures (10 to -25°C), cells exposed to ultra-low temperatures ($< -30^{\circ}\text{C}$) may also undergo a more rapid, early onset apoptosis.

Human prostate cancer cells (PC3) were exposed to temperatures of -60 , -30 , and -15°C to simulate a cryoablative procedure. By utilizing flow cytometry, fluorescent microscopy, and western blot analyses, samples were interrogated at various times post-thaw to identify the stress pathways involved in cell death. The results indicate that at ultra low temperatures (below -30°C) a significant population of cells underwent programmed cell death within as little as 30 min of thawing, attaining a maximum of $\sim 40\%$ at 90 min, and by 6 hr post-thaw only necrotic cells were observed. At elevated sub-freezing temperatures (above -30°C), however, the activation and progression of apoptosis occurred in a more delayed manner and was not noted until 6–24 hr post-thaw. The levels of apoptosis were also significantly lower with $\sim 10\%$ of cells undergoing apoptosis at 6 hr post-thaw following exposure -15°C and $\sim 25\%$ at 6 hr post-thaw for cells frozen to -30°C . Additionally, it was found that early onset apoptosis progressed through a membrane mediated caspases-dependent mechanism (extrinsic) while delayed apoptosis involved both extrinsic and intrinsic (mitochondrial) pathways.

These data demonstrate the impact of apoptotic continuum whereby the more severe the cryogenic stress activates the extrinsic, membrane regulated apoptotic pathway while less severe freezing activates the intrinsic, mitochondrial mediated path. The rapid induction and progression of apoptosis at ultra low temperatures provides an explanation as to why such results have not previously been identified following freezing both in cryoablative or cryopreservation settings. Ultimately, it is our aim to decipher the events and signaling pathways that are specifically involved in triggering rapid-onset apoptosis. Once known, cryosurgical procedures might be modified such that rapid-onset and delayed programmed cell death pathways can be selectively induced, in an effort to improve the overall efficacy of cryoablation. Early evidence suggesting that select cryo-sensitizers offer the potential to improve freeze sensitivity will be presented.

Жизнеспособность и дифференцировка костного мозга гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток, криоконсервированных при -196°C с 1972 года

С. СУМИДА, Т. КИТАМУРА, Н. МОТОМУРА, А. САЙТО

Клиника и лаборатория криомедицины и переливания крови д-ра Саджио Сумиды
Тканевой банк, Отделение сердечно-сосудистой хирургии, Факультет медицины Токийского
Университета

Viability and Differentiation of Bone Marrow Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Cryopreserved at -196°C since 1972

S. SUMIDA, T. KITAMURA, N. MOTOMURA, A. SAITO

Dr. Sajio Sumida Clinic and Lab Cryomedicine and Blood Transfusion
Tissue Bank, Department of Cardiovascular Surgery, Tokyo University School of Medicine, Japan

Это исследование было проведено для подтверждения жизнеспособности и дифференцировки в культуре деконсервированных клеток костного мозга, клеток пуповины и лимфоцитов периферической крови, криоконсервированных с 1972 года в течение 30–40 лет.

Аутологичные клетки костного мозга в количестве $5,1 \pm 2,9 \times 10^{6-9}$ были собраны для лечения 293 больных с распространенным солидным раком перед химиотерапией. Эти клетки суспендировали в 15%-м (конечная концентрация) растворе глицерина в тканевой культуральной среде 199 (в 1972–1980 гг.) или в 10%-м (конечная концентрация) растворе ДМСО на основе аутологичной плазмы в тefлоновом/каптоновом контейнере, охлаждали до $-75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ со скоростью 2–5 град/мин с использованием программного замораживателя и хранили в жидком азоте 30–40 лет при температуре -196°C , начиная с 1972 года. Контейнеры с клетками костного мозга, которые не использовали для лечения пациентов, постоянно хранятся в хранилище с жидким азотом до сегодняшнего дня. В 2010 году часть образцов была разморожена для изучения жизнеспособности и дифференцировки гемопоэтических (ГСК) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Размороженные клетки культивировали в чашках Петри с культуральной средой и соответствующими факторами роста: сыворотками взрослого человека и/или лизатом клеток крови мечехвоста в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 . Культуральная среда заменялась регулярно, два-три раза в неделю.

Исследования показали: что моноцитарные и эритробластные КОЕ были обнаружены в 96% деконсервированных клеток костного мозга. Восстановление ГСК деконсервированного костного мозга (15 марта 2012 года) соответствует уравнению регрессии: $Y = -0,0003X + 0,0367$, т. е. замораживание в жидком азоте мало влияет на количество восстановленных КОЕ-С клеток костного мозга. Повышенная экспрессия поверхностных маркеров: CD2, 4, 11b, 13, 16, 33, 38, HLA-DR и GP означает, что именно факторы роста в средах эффективно стимулируют пролиферацию и дифференцировку этих клеток для экспрессирования поверхностных маркеров. Некоторые колонии клеток, образованные на 5–7 день культивирования, сохранялись до 3 месяцев (4–6 пассажей). Колонии МСК, перициты и фибробласты обнаружены в 8% оттаянного костного мозга. Перициты и фибробласты, прикрепившиеся ко дну чашки, росли и покрывали всю ее поверхность, а также участвовали в построении необычных «конфлюентных» структур на поверхности культуры. Некоторые из этих структур обладали свойством автосохранения. ГСК успешно культивировали поверх конфлюентного слоя фибробластов. Не наблюдалось бактериального заражения в результирующей культуре. Хранение стволовых клеток, а также клеток пуповинной крови при -60 до -80°C в механическом холодильнике или в парах жидкого азота не позволило после отогрева получить колонии, вероятно, из-за нестабильного температурного режима, вызванного открыванием двери, приводящего к фатальной рекристаллизации в клеточных суспензиях.

This study was performed to confirm viability and differentiation in culture of the thawed bone marrow cells, umbilical cord cells, and peripheral lymphocytes which had been cryopreserved for 30–40 years since 1972.

Autologous bone marrow cells of $5.1 \pm 2.9 \times 10^{6-9}$ were harvested for salvage of 293 advanced solid cancer patients before chemo-ablation, suspended in a 15% (final concentration) glycerol in a tissue culture medium 199 in 1972–1980, or in a 10% (final concentration) Me_2SO in the autologous plasma solution, enclosed in a Teflon-Capton bag, cooled down to around $-75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ at a controlled rate of 2–5 deg/min using programmed cooling device, and preserved in a liquid phase of liquid nitrogen for 30 to 40 years at -196°C since 1972. Containers with bone marrow cells which were not used to treat patients had been continuously preserved in liquid nitrogen stocker until today. In 2010 we decided to thaw those cells in order to study the viability and differentiation of hematopoietic (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs). Thawed cells were cultured in Petri dish with culture media and appropriate growth factors: adult human sera and/or limulus (horseshoe crab) blood cell lysate in special incubator maintaining the correct conditions of 37°C and 5% CO_2 . The culture medium was replenished at regular time intervals, two to three times per week.

The studies showed that: monocytes- and erythroblast-CFU appeared in 96% of thawed bone marrow. Recovery (%) of HSCs of thawed marrows gave the regression equation: $Y = -0.0003X + 0.0367$ on March 15, 2012, which suggests that freezing in liquid nitrogen hardly influences the CFU-C recovery (%) of marrow stem cells. The increased expression of surface markers: CD2, 4, 11b, 13, 16, 33, 38, HLA-DR, and GP-A clarified that the right growth factors in the media effectively stimulated the proliferation and differentiation of those cells to express surface makers. Some colony cells of Day 5–7 continuously survived to form colonies for up to minimum 3 months as the 4th–6th passages. Colonies of MSCs, pericytes and fibroblasts appeared in 8% of thawed bone marrows. Pericytes and fibroblasts attached to the bottom of dish to grow up and covered the entire surface of the dish, and recruited to construct interesting ‘confluent’ frameworks on the surface in culture. Some of these structures showed automatically contraction, suggesting MSCs differentiation into cardiomyocytes or other cell types. HSCs were successfully cultured on top of a confluent layer of fibroblasts. Although 6 of 90 containers ruptured during thawing, but there were neither bacterial contamination nor obstacles in the culture results afterward. The cryopreservation of stem cells and also cord blood cells at -60 to -80°C in the mechanical freezer and in the vapour phase of liquid nitrogen did not constantly succeed in the formation of colonies, probably due to long-termed duration of unstable temperatures caused by the repetitive opening and shutting of the door, resulting in fatal recrystallization of the cells.

Гипотермическая аппаратная перфузия донорской печени человека с помощью перфузионной системы с контролируемым давлением. Первые результаты использования одно- и двухпоточковых вариантов

Б. ФУЛЛЕР, А. ДЖОМАА, К. ГУРУСАМИ, Б. ДЕВИДСОН

Университетский Колледж Лондона, Роял Фри Кампус, Лондон, Великобритания

Hypothermic Machine Perfusion of Human Donor Livers Using a Pressure Controlled Perfusion System. Initial Results on Single or Dual-Flow Modalities

B. FULLER, A. JOMAA, K. GURUSAMY, B. DAVIDSON

University College of London, Royal Free Campus, London, UK

По сравнению с традиционным гипотермическим хранением на холоде гипотермическая аппаратная перфузия (ГАП) показала более высокие результаты при консервации почек. Похожие обнадеживающие результаты были получены для ГАП печени как на модели больших, так и малых животных, однако данные о состоянии печени человека при использовании ГАП по-прежнему остаются недостаточными. Целью данного исследования является создание надежного метода ГАП для хранения печени человека с использованием системы с контролируемым давлением; оценка того, может ли стерильность обеспечиваться на протяжении всей процедуры; оценка типов перфузии (использование только артерий, только воротных вен или тех и других одновременно).

В исследованиях использовали образцы печени от 16 человек (отклоненные от трансплантации всеми центрами Великобритании, но с наличием соответствующего согласия на проведение исследований), которые в случайном порядке были поделены на 4 группы: Группа 1 – 7 ч гипотермического хранения (ГХ) и 1 ч ГАП через печеночную артерию (ПА) (n = 4); группа 2 – 7 ч ГХ и 1 ч ГАП через печеночную артерию (ПА) и воротную вену (ВВ) (n = 4); Группа 3 – 7 ч ГХ и 1 ч ГАП через ВВ (n = 4); Группа 4 – 8 ч простого ГХ в растворе UW. Использовалась система с контролируемым давлением, основанная на аппарате для перфузии почек «Lifeport», в котором поток автоматически регулируется в зависимости от сопротивления для поддержания постоянного давления (7 мм рт. ст. для ВВ и 30 мм рт. ст. для ПА). Печень перфузировали при 4–8°C с использованием раствора для перфузии почки «Belzers KPS» в стерильных условиях. Параметры перфузии (давление, поток, сопротивление и температура) регистрировали каждые 15 мин. Образцы перфузата для определения микробной контаминации и чувствительности были взяты до и после перфузии.

Исследования показали, что давление 30 мм рт.ст. в ПА и давление 7 мм рт. ст. в ВВ сохранялись в течение перфузии. Величины потока в ПА и ВВ находились в диапазоне от 11 до 107 мл/мин (в среднем 59,5 мл/мин) и от 39 до 199 мл/мин (в среднем 96,2 мл/мин). Сопротивление для ПА и ВВ колебалось от 0,17 до 1,99 (среднее 0,71) и от 0,07 до 0,17 мм рт.ст./мл/мин (в среднем 0,08). Температуру поддерживали в пределах от 4 до 8°C с помощью теплообменника. Исследования на микробную контаминацию и чувствительности перфузата показали, что стерильность поддерживается на протяжении всей процедуры.

Из проведенных исследований можно заключить, что наша методика зарекомендовала себя как надежный и воспроизводимый метод для ГАП доноров печени. Сопротивление в ПА было выше, чем в ВВ, в то время как поток в ПА был меньше, чем в ВВ. Стерильность можно поддерживать в течение всего процесса перфузии. Эти данные служат основой для дальнейшей оценки ГАП печени как метода сохранения печени во время ее клинической трансплантации.

Hypothermic machine perfusion (HMP) has shown superior results to conventional cold storage method in kidney preservation. Similar promising results have been reported for HMP of livers in both small and large animal models; however data from human livers during HMP remain scarce. The aims of this study is to establish a reliable method of HMP of human livers using a pressure controlled system, to assess if sterility can be maintained through out the procedure, and evaluate modes of perfusion (artery alone, portal vein alone, or both simultaneously).

Methods: 16 human livers rejected for transplant by all UK centres but which had appropriate consent for research were randomised into 4 groups. Group 1: 7 hours cold storage and one hour HMP through hepatic artery (HA) alone (n = 4). Group 2: 7 hours cold storage and 1 hour HMP through hepatic artery (HA) and portal vein (PV) (n = 4). Group 3: 7 hours cold storage and 1 hour HMP through PV (n = 4). Group 4: 8 hours simple cold storage using UW solution. A pressure controlled system where flow is automatically adjusted according to resistance to maintain a constant pressure (7 mm Hg for PV and 30 mm Hg for HA) was used, based on the Lifeport kidney machine using Belzers KPS perfusate. Livers were perfused at 4 to 8°C using KPS solution under sterile conditions. Perfusion parameters (pressure, flow, resistance and temperature) were recorded every 15 min. Perfusate samples for microbial culture and sensitivity were taken before and after the perfusion.

Results: HA pressure of 30 mmHg and PV pressure of 7 mm Hg were maintained throughout the perfusion. HA and PV flow ranged from 11 to 107 ml/min (average 59.5 ml/min) and 39 to 199 ml/min (average 96.2 ml/min). HA and PV resistance ranged from 0.17 to 1.99 (average 0.71) and 0.07 to 0.17 mmHg/ml/min (average 0.08). Temperature was maintained between 4 and 8°C using the supplied heat exchanger. Microbial culture and sensitivity results from the perfusate showed that sterility was maintained throughout the procedure.

Conclusion: Our technique proved to be a reliable and reproducible method of donor liver HMP. Resistance in HA was higher than in PV, while flow in the HA was less than the PV. Sterility could be maintained throughout the perfusion process. These data provide a basis for further evaluation of liver HMP as a method for preserving livers during clinical hepatic transplantation.

Электрический пробой клетки: теоретический анализ и практическое применение

Е.А. ГОРДИЕНКО, Е.И. СМОЛЯНИНОВА, О.А. СТРИХА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Electrical Breakdown of Cell: Theoretical Analysis and Practical Application

E.A. GORDIENKO, E.I. SMOLYANINOVA, O.A. STRIKHA

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Электрический пробой (ЭП) или электропорация биологической мембраны – это явление временного или необратимого нарушения ее барьерной функции, которое происходит, когда мембранный потенциал превышает некоторое пороговое значение. Это значение зависит как от величины и длительности гиперполяризации или деполяризации, так и от электрических и механических свойств самой мембраны.

В настоящее время ЭП применяются для: 1) стерилизации растворов и жидких сред путем электропорации микроорганизмов под влиянием приложенных извне импульсов электрического поля; 2) диагностики функционального состояния клеток по их устойчивости к электрическому пробую; 3) введения внутрь липидных везикул и клеток лекарственных веществ, молекул ДНК, РНК, метаболитов и молекулярных зондов, для реализации технологии клонирования млекопитающих при пересадке ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты, для трансдермального переноса лекарственных веществ в организм человека.

Общебиологическое значение исследования закономерностей и механизмов ЭП обусловлено тем, что это явление рассматривается как универсальный механизм разрушения клеток и клеточных органелл. Поскольку пороговое значение мембранного потенциала, вызывающее электропорацию биомембран, не слишком отличается от потенциалов покоя клеток, можно предположить, что при криоконсервировании клеток, в процессе которого состав, ионная сила, рН и физико-химические свойства клеточных мембран значительно изменяются, их самопроизвольный электрический пробой при определенных условиях становится неизбежным.

Созданная нами физико-математическая модель электропорации сферической липидной везикулы или клетки опирается на фундаментальные принципы теории упругости тонких оболочек, термодинамики и электродинамики. В отличие от существующих эта модель учитывает, что свободная энергия мембраны в процессе образования в ней макроскопической поры изменяется не только за счет изменения емкости мембраны и поверхностной энергии стенки поры, но и за счет деформации мембраны, которая при этом возникает. Вычислено изменение свободной энергии мембраны в зависимости от радиуса мембранной поры для ооцитов мыши и, исходя из термодинамического принципа минимума свободной энергии и теории процессов активационного типа, объяснены закономерности электропорации.

Electrical breakdown (EB) or electroporation of biological membrane is the phenomenon of temporary or irreversible disorder in its barrier function, occurring when the membrane potential exceeds some threshold value. This value depends on both extent and duration of hyperpolarization or depolarization, and electrical and mechanical properties of membrane itself.

Nowadays the EB is used for the following purposes: 1) sterilization of solutions and liquid media via microorganism electroporation under externally applied pulses of electric field; 2) diagnosis of cells functional state by their resistance to electrical breakdown; 3) internal introduction of lipid vesicles and medicinal substance cells, molecules of DNA, RNA, metabolites and molecular probes to implement the mammalian cloning technology when transferring nuclei of somatic cells into enucleated oocytes, for transdermal drug transportation into human organism.

Common biological importance of studying the EB patterns and mechanisms is stipulated by considering this phenomenon as unified mechanism of cell and cell organelle destruction. Since a threshold value of membrane potential, causing the biomembrane electroporations, is not much different from rest potential of cells, it may be assumed that under cell cryopreservation, when the composition, ionic strength, pH, and physical and chemical properties of cell membranes change in a great extent, their spontaneous electrical breakdown becomes inevitable under certain conditions.

The designed by us physical and mathematical model of electroporation of spherical lipid vesicle or cell is based on fundamental principles of the elasticity theory of thin membranes, thermodynamics and electrodynamics. In contrast to the existing models, this one takes into account the fact that a free energy of membrane during formation in it of macroscopic pore varies not only due to changing the membrane capacitance and surface energy of pore wall, but also because of membrane deformation, which in this case arises. There was calculated the change in membrane free energy depending on membrane pore radius for murine oocytes and explained the electroporation patterns, proceeding from the thermodynamic principle of free energy minimum and theory of activation type processes.

Фазовые состояния водных растворов криопротекторных веществ

А.И. ОСЕЦКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Phase States of Aqueous Solutions of Cryoprotective Substances

A.I. OSETSKY

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

В работе анализируются закономерности кристаллизации наиболее востребованных при реализации технологий криоконсервирования водных растворов полиолов и спиртов. Показано, что диаграммы состояний этих растворов имеют ряд очень важных для практической криобиологии особенностей:

– существует определенная концентрация криопротекторного вещества C_g , ниже которой в охлаждаемых растворах не образуются отдельные кристаллы этого вещества, что полностью исключает возможность эвтектической кристаллизации данных растворов [A.I. Osetsky, 2009];

– в изученных растворах наблюдается особый вид кристаллизации, приводящий к образованию новой кластерной фазы [A.I. Osetsky, 2011], в результате чего ниже некоторой характерной температуры T_c криопротекторные растворы должны рассматриваться как трехфазные системы «раствор – кристаллы льда – кластерные частицы»;

– существует интервал концентраций $C_c \dots C_g$, в котором происходит только кластерная кристаллизация и наблюдается особый вид переохлаждения раствора, когда кристаллизация практически отсутствует при охлаждении и протекает только при последующем отогреве сразу после расстеклования аморфной фракции.

Экспериментально показано, что в зависимости от типа криопротекторного вещества образуются кластерные частицы двух видов, представляющих собой нанокристаллы льда, окруженные кристаллической (например, растворы ДМСО) или аморфной (например, растворы глицерина) оболочкой из молекул криопротектора. Это обстоятельство ухудшает защитные свойства криопротекторов, образующих кластерные частицы второго типа. Их появление вблизи температур стеклования сопровождается увеличением объема и приводит к резкому скачку давления в расстекловавшихся жидких микрофазах. Как следствие происходит повреждение биообъектов за счет пластической релаксации этих давлений. Данный факт следует учитывать при выборе оптимальных концентраций криопротекторных веществ, особенно таких как глицерин и ПЭО, образующих кластерные частицы с аморфными поверхностными оболочками.

The crystallization regularities for the most actual aqueous solutions of polyols and alcohols, when implementing the cryopreservation technologies have been analyzed in this research. State diagrams for these solutions have been shown to have a number of very important peculiarities for practical cryobiology such as:

– certain concentration of cryoprotective substance C_g , below which no separated crystals of this substance are formed in solutions under cooling, completely excluding the possibility of eutectic crystallization of these solutions [A.I. Osetsky, 2009];

– in the studied solutions there is observed a special crystallization type, resulting in new cluster phase formation [A.I. Osetsky, 2011], whereby below a certain characteristic temperature T_c the cryoprotective solutions should be considered as the three-phase systems ‘solution – ice crystals – cluster particles’;

– there is the concentration interval $C_c \dots C_g$, where only a cluster crystallization occurs and a special type of solution overcooling is observed, when the crystallization is virtually absent under cooling and proceeds just during following thawing right after amorphous fraction devitrification.

It was experimentally demonstrated, that depending on a kind of cryoprotective substance there were formed the cluster particles of two types, representing the ice nanocrystals, surrounding by crystalline (for example, DMSO solutions) or amorphous (glycerol ones, for instance) membranes from cryoprotectant molecules. This circumstance worsens the protective properties of cryoprotectants, forming the cluster particles of the second type. Their occurrence near devitrification temperature is accompanied by an increase in volume and results in a sharp pressure jump in devitrified liquid microphases. As a result, the bioobject injury occurs due to plastic relaxation of these tensions. This fact should be taken into account when selecting the optimal concentrations of cryoprotective substances, especially such as glycerol and PEO, forming cluster particles with amorphous superficial membranes.

Эволюция рыб и криорезистентность сперматозоидов

Е.Ф. КОПЕЙКА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Fish Evolution and Sperm Cryoresistance

E.F. KOPEYKA

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

В процессе длительной эволюции рыбы заселили почти все водные ниши Земного шара с разной температурой, соленостью и гидростатическим давлением. В результате взаимодействия исходных геномов клеток рыб с изменявшимися факторами окружающей среды в каждой нише возникли популяции рыб, у которых свойства большинства клеток стали адекватны нише обитания или размножения. Поэтому криорезистентность сперматозоидов рыб из разных ниш может сильно отличаться. Чтобы понять ее природу, необходимо определить экстремальные факторы криоконсервирования, наиболее уязвимые структуры сперматозоидов, а также рассмотреть, как в процессе эволюции факторы среды повлияли на молекулярные структуры и функциональные характеристики клеток. К основным повреждающим факторам криоконсервирования следует отнести изменения осмотичности среды и эффекты кристаллизации, которые в первую очередь влияют на мембраны и акросому. Сила воздействия каждого из них зависит от исходного состояния криоконсервированных клеток занимаемой ими ниши и протокола криоконсервирования. Наиболее сильным фактором среды является температура, влияющая на общую организацию клеток, скорость реакций, на структуру и свойства их мембран. В клетках рыб, живущих при минусовых температурах, синтезируются антифризы, что повышает их криорезистентность. Дефицит энергии и необходимость поддержания определенных скоростей реакций при пониженных температурах компенсируются у них снижением прочности связей между структурными элементами клеток. Поэтому у лососевых выживаемость сперматозоидов после криоконсервирования ниже, чем у карпов, нерестящихся при более высоких температурах. Кроме того, высокая ненасыщенность жирных кислот фосфолипидов мембран лососевых также снижает их криорезистентность. Сохранить функции клеток при разных температурах можно лишь при жидкокристаллическом состоянии мембран, что достигается изменением соотношения между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов мембран. С повышением температуры нереста увеличиваются насыщенность жирных кислот фосфолипидов и количество холестерина в мембранах, что снижает их чувствительность к изменениям осмотичности среды. Аналогичный эффект наблюдается и у рыб, нерестящихся в морской воде, так как их сперматозоиды активируются в гипертоничных средах. У рыб, нерестящихся в пресной воде, активация сперматозоидов происходит в условиях гипотонии, поэтому они могут быть более чувствительны к экстремальным факторам криоконсервирования. Таким образом, анализ криорезистентности сперматозоидов рыб из разных ниш позволяет нам утверждать, что она имеет полифакторную природу.

During continuous evolution fishes inhabited almost all the aquatic niches of the Earth with different temperature, salinity and hydrostatic pressure. Due to interaction between initial gene pools of fish cells with changed environmental factors fish populations appeared in every niche. These populations had properties of the most part of cells which were adequate to their niche of habitation or breeding. Therefore cryoresistance of fish spermatozoa from various niches can greatly differ. To understand its nature, it is necessary to determine the extreme cryopreservation factors, the most vulnerable structures of spermatozoa, as well as to consider how the evolution of environmental factors influenced the molecular structures and functional characteristics of cells. The main damaging factors of cryopreservation should include the changes in osmolality environment and crystallization effects, which primarily affect the membrane and acrosome. The impact strength for each of them depends on the initial state of cryopreserved cells, their occupied niches and the cryopreservation protocol. The strongest environmental factor is the temperature affecting a complete cell organization, response rate on the structure and properties of these membranes. In the cells of fish inhabiting under subzero temperatures, antifreezers are synthesized, increasing their cryoresistance. Energy deficiency and necessity to maintain certain response rates at low temperatures are compensated by reduction of bond strengths between structural elements of cells. Therefore, salmon sperm survival after cryopreservation is lower than carp one spawning under higher temperatures. Furthermore, a high unsaturation of fatty acids of salmon membrane phospholipids also reduces their cryoresistance. To preserve cell functions under different temperatures is possible only if the liquid-crystalline state of membranes achieved by varying the ratio between saturated and unsaturated fatty acids of membrane phospholipids. As the temperature rises the spawning of saturated fatty acids and cholesterol phospholipids in membranes is increased, reducing their sensitivity to changes in medium osmolality. Similar effect is observed in fish spawning in sea water, whereas their spermatozoa are activated in hypertonic media. Fish spawning in fresh water, sperm activation occurs under hypotension, so they may be more sensitive to extreme factors of cryopreservation. Thus, the analysis of fish sperm cryoresistance from different niches allows us to confirm that it is of multiple-factor nature.

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

А.Ю. ПЕТРЕНКО, Ю.А. ПЕТРЕНКО, В.С. ЗАЙКОВ, А.И. ПРАВДЮК, Н.А. ТРУФАНОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells Within Alginate Microspheres

A.YU. PETRENKO, YU.A. PETRENKO, V.S. ZAYKOV, A.I. PRAVDYUK, N.A. TRUFANOVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Одним из перспективных направлений тканевой инженерии является инкапсуляция клеток в микроносители. Клетки, заключенные в микросферы, при трансплантации не подвергаются атаке иммунной системы организма, что обеспечивает их длительное функционирование. В связи с этим инкапсулированные клетки находят все более широкое применение в регенеративной медицине, что требует разработки подходов для их длительного хранения. Кроме того, клетки в составе микросфер можно рассматривать как специфическую криобиологическую модель ткани, в которой клетки иммобилизованы, но лишены межклеточных контактов. В качестве «клеточной» составляющей тканевой инженерной конструкции высоким регенеративным потенциалом обладают мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), поскольку они способны дифференцироваться в различные типы клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

Цель настоящей работы – изучение особенностей ответа МСК в составе альгинатных микросфер на традиционные методы криоконсервирования и витрификации.

Инкапсулированные МСК криоконсервировали в криозащитных средах, эффективность которых была продемонстрирована на суспензии МСК. Общепринятое криоконсервирование проводили под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) в присутствии сыворотки по разным протоколам замораживания. Витрификацию осуществляли в мультикомпонентной среде ДЭПС-1, содержащей ДМСО, этиленгликоль, 1,2-пропандиол и сахарозу. В обоих случаях образцы криоконсервировали в стандартных криопробирках и хранили в жидком азоте.

При культивировании в составе альгинатных микросфер МСК сохраняли жизнеспособность и метаболическую активность, но прекращали делиться. Ответ клеток, заключенных в микросферы, на общепринятое криоконсервирование был аналогичным клеткам в суспензии. Наиболее высокие уровни жизнеспособности и метаболической активности были получены при использовании медленного ступенчатого охлаждения с инициацией кристаллообразования под защитой 10% ДМСО. Однако для успешной витрификации инкапсулированных клеток условия, обеспечивающие жизнеспособность клеток в суспензии, оказались неприемлемыми из-за более медленного распределения криопротекторов между клетками и средой. Модификация условий эквilibрации позволила добиться уровня жизнеспособности инкапсулированных МСК на уровне клеток в суспензии. МСК, криоконсервированные как общепринятым методом, так и путем витрификации, сохраняли специфический иммунофенотип и способность к мультилинейной дифференцировке, что свидетельствует о перспективности обоих подходов для долгосрочного хранения клеток в составе микросфер.

One of the advanced directions in tissue engineering is encapsulation of cells into microcarriers. The cells, encapsulated into microspheres, do not undergo any attacks from an organism's immune system during transplantation that provides their long-term functioning. In this case the encapsulated cells become more widely used in regenerative medicine, requiring the development of approaches for their long-term storage. In addition, cells within the microspheres may be considered as a specific cryobiological model of tissue, where the cells are immobilized. However, in this case the cell-to-cell contacts are absent. The multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) have a high regenerative potential as a 'cellular' component in tissue-engineering constructs, due to their capacity to differentiate into different cell types both *in vitro* and *in vivo*.

This research was directed to study the peculiarities of MSCs response as a part of alginate microspheres to the conventional cryopreservation methods and vitrification.

The encapsulated MSCs were cryopreserved in cryoprotective media previously described as effective for MSCs suspensions. The standard cryopreservation procedure was carried-out under protection of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the presence of serum with the application of different freezing protocols. The vitrification was performed in multicomponent solution DEPS-1, containing DMSO, ethylene glycol, 1,2-propanediol and sucrose. In both cases the samples were cryopreserved in the standard cryovials and stored in liquid nitrogen. During culturing within alginate microspheres MSCs preserved the viability and metabolic activity, however were not able to proliferate. The response of cells encapsulated into microspheres to the standard cryopreservation protocol was similar to those in suspension. The highest levels of viability and metabolic activity were obtained under protection of 10% DMSO with slow stepwise cooling and initiation of ice crystals formation. However, for successful vitrification of encapsulated cells the conditions, providing survival of cells in suspension, appeared to be not acceptable due to slower penetration and distribution of cryoprotectants between cells and medium. The modification of equilibration conditions enabled to achieve the viability of encapsulated MSCs at the same level as for cells in suspension. The MSCs cryopreserved according to both standard method and vitrification, preserved a specific immunophenotype of cells and their ability for a multilineage differentiation, thus testifying to the perspective of both cryopreservation approaches for long-term storage of cells within the alginate microspheres.

Структура поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови

А.М. ЧЕРНЫШ, А.М. ГОЛУБЕВ, Е.К. КОЗЛОВА, В.А. СЕРГУНОВА
Научно-исследовательский институт общей реаниматологии
им. В.А. Неговского РАМН, г. Москва

Surface Structure of Erythrocyte Membranes Under Long-Term Storage of Donor's Blood

A.M. CHERNYSH, A.M. GOLUBEV, E.K. KOZLOVA, V.A. SERGUNOVA
V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology
of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

При длительном хранении донорской крови эритроциты, помещённые в искусственную среду гемоконсерванта, изменяют свое функциональное состояние. При этом изменяется их морфология. Для изучения механизмов повреждения клеток крови необходимо исследовать изменение наноструктуры поверхности мембран.

Цель работы – изучить изменения наноструктуры поверхности мембран эритроцитов при хранении донорской крови в течение 30 суток.

Забор крови осуществили на базе городской клинической больницы им. С.П. Боткина у 4 здоровых доноров в возрасте от 27 до 35 лет и хранили в контейнерах с консервантом ЦФДА-1 в течение 30 суток при температуре 4°C в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Все доноры дали добровольное согласие на исследование своей крови в соответствии с нормами этического комитета НИИОР. В день проведения опыта (1, 6, 12, 19 и 30-е сутки хранения) отбирали пробу (10 мл). Опыты проводили при температуре 19°C. Изображения клеток и мембран получали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ), «NTEGRA prima» («NT-MDT», Россия). Для исследования изменения наноструктуры использовали метод калиброванной электропорации. Проводили анализы крови.

АСМ-изображения ансамбля клеток в поле 100×100 мкм показали, что в 1-е сутки хранения преобладали дискоциты 85 ± 7%, на 6-е сутки количество эхиноцитов увеличилось до 38 ± 5%, а на 30-е сутки – до 96 ± 3% (в основном сфероэхиноцитов). АСМ-изображения в поле 10×10 мкм позволили выявить структурные особенности отдельных клеток. АСМ-изображения в поле 1×1 мкм показали, что в процессе хранения возникали нарушения наноструктуры мембран красных клеток крови. На 6-е сутки появлялись дефекты в мембране ($D = 80\text{--}100$ нм, $h = 6\text{--}10$ нм). На 19-е сутки появлялись многоуровневые выросты ($D = 500\text{--}800$ нм, $h = 50\text{--}120$ нм), при этом существенно изменялась морфология клеток. Изменение параметров наноструктуры мембран хорошо коррелировало с изменением константы скорости гемолиза при калиброванной электропорации. Во время хранения одновременно с изменением наноструктуры мембран клеток происходило и изменение параметров крови: уменьшение восстановленного глутатиона, концентрации глюкозы, рН, гематокрита; увеличение содержания ионов K^+ и гемоглобина в плазме; достоверных изменений активности каталазы и спектра оксигемоглобина не зафиксировано.

Длительное (до 30 суток) хранение цельной крови при 4°C сопровождается изменением наноструктуры мембран эритроцитов, что хорошо коррелирует с динамикой изменения морфологии клеток и результатами анализов крови.

During donor's blood long-term storage the erythrocytes, placed into an artificial medium of hemopreservative, change their functional state. In this case their morphology alters as well. In order to study the injury mechanisms of blood cells of necessity is to investigate a changed nanostructure of membrane surface. This research was aimed to study a change in nanostructure of erythrocyte membrane surface during donor's blood storage within 30 days. Blood sampling was implemented at S.P. Botkin City Clinical Hospital in 4 healthy donors aged from 27 to 35 years and stored into the containers with CPDA-1 preservative for 30 days at 4°C in accordance with the WHO guidelines. All donors gave a voluntary consent for their blood study according to the statements of Ethics Committee of V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of the Russian Academy of Sciences. On the day of experiment performance (1, 6, 12, 19 and 30 day of storage), a sample (10 ml) was collected. The experiments were carried-out at 19°C. The images of cells and membranes were obtained using the atomic force microscope (AFM), NTEGRA prima (NT-MDT, Russia). The method of calibrated electroporation was applied to investigate the change in nanostructure. Blood tests were done.

The AFM images of cells ensemble in 100×100 μm field showed diskocytes of 85 ± 7% as predominating in the 1st day of storage, to the 6th and 30th days a number of echinocytes increased up to 38 ± 5 and 96 ± 3% (mostly spheroechinocytes), correspondingly. The AFM images in 10×10 μm field enabled the revealing of structural peculiarities of certain cells. Those in 1×1 μm showed the disorders in erythrocyte membrane nanostructure as occurring during storage. To the 6th day the defects in membrane ($D = 80\text{--}100$ nm, $h = 6\text{--}10$ nm) occurred. To the 19th day the multilayered processes ($D = 500\text{--}800$ nm, $h = 50\text{--}120$ nm) occurred, herewith there was a significant change in cell morphology. The altered parameters in membrane nanostructure correlated well with a change in hemolysis rate constant under calibrated electroporation. During storage, simultaneously with an alteration in cell membrane nanostructure the blood parameters changed as well: decrease in reduced glutathione, glucose concentration, pH, hematocrit, increase in K^+ ions and hemoglobin content in plasma; no statistically significant changes in catalase activity and oxyhemoglobin spectrum were recorded.

A long-term (up to 30 days) storage of the whole blood at 4°C is accompanied by change in erythrocyte membranes nanostructure, correlating well with the dynamics of change in cell morphology and blood test results.

Экстремальная криотерапия как модель психофизиологического стресса

О.А. ПАНЧЕНКО

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк
ГУ "Научно-практический медицинский реабилитационно-диагностический центр МЗ Украины", г.Донецк

Extreme Cryotherapy as Model of Psychophysiological Stress

O.A. PANCHENKO

M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk, Ukraine
Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic Center
of the Ministry of Health Care of Ukraine, Donetsk, Ukraine

В исследовании принимали участие 259 человек (66% женщин и 34% мужчин) в возрасте от 18 до 75 лет, находящихся на амбулаторном лечении в ГУ «НПМ РДЦ» МЗ Украины и прошедших 20-дневный курс криотерапии. Криотерапию осуществляли по методике R. Fricke с применением криокамеры «Cryo Therapy Chamber» («Zimmer Medizin Systeme», Германия), -110°C . Проводились клинические, физиологические, психологические, функционально-диагностические, клинико-лабораторные исследования.

В результате курса криотерапии снижается средняя поверхностная температура тела (СПТТ), которую измеряли до сеанса криотерапии, от первичного уровня $32,6^{\circ}\text{C}$ до значений $32,2^{\circ}\text{C}$ на 41-й минуте суммарного времени криовоздействия (СВК) ($p < 0,05$). Внутренняя температура тела остается в диапазоне гомеостатических значений. Реакция гемодинамических показателей на сеанс криотерапии проявляется в повышении АДс в среднем на 9 мм рт.ст. и АДд – на 4 мм рт.ст., ЧСС снижается на (13 ± 2) 1/мин, в результате курса АД оптимизируется. Курс криотерапии оказывает оптимизирующее влияние на функцию внешнего дыхания, которое проявляется в росте значений максимальной вентиляции легких у мужчин с (105 ± 9) до (128 ± 9) л/мин, у женщин с (75 ± 4) до (81 ± 5) л/мин ($p < 0,05$). После курса криотерапии приводит к увеличению значений показателей вариабельности сердечного ритма RMSSD, rNN50 и снижению значений показателей ИВР, ИН и ВПР ($p < 0,05$), что свидетельствует о повышении активности автономного контура регуляции и снижении активности центрального контура регуляции. Значения ПАРС уменьшаются у мужчин с $(2,1 \pm 0,3)$ до $(1,8 \pm 0,7)$ балла, а у женщин с $(2,2 \pm 0,2)$ до $(1,6 \pm 0,5)$ балла ($p < 0,05$), что свидетельствует о снижении напряжения регуляторных систем. В результате курса уровень кортизола в сыворотке крови снижается от первичных значений (436 ± 26) до (365 ± 31) нмоль/л в период с 31 до 80-й минуты СВК ($p < 0,05$). В результате криотерапии оптимизируются значения скорости зрительно-моторных реакций, увеличивается мышечная сила, мышечная выносливость, уменьшаются показатели хронаксии, биологического возраста, улучшается самочувствие, повышается активность, настроение обследуемых, нормализуется психологическое состояние ($p < 0,05$).

Таким образом, криоэкстремальная терапия представляет собой стрессовое воздействие, выходящее за границы адаптивной нормы и вызывающее психофизиологические изменения в различных системах организма человека. Реакция систем организма на криовоздействие является моделью психофизиологического стресса, параметры которой оцениваются по ряду представленных психофизиологических и биофизических показателей.

The research involved 259 people (66% women and 34% men) of 18 to 75 years who are ambulatory treated at the Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic Center of the Ministry of Health Care of Ukraine and have been underwent 20-day cryotherapy course. Cryotherapy was performed by R. Fricke method using cryochamber Cryo Therapy Chamber (Zimmer Medizin Systeme, Germany, -110°C). Clinical, physiological, psychological, functional and diagnostic, clinical and laboratory investigations were performed.

As a result of cryotherapy an average organism's surface temperature (AOST) decreases, it was measured prior to cryotherapy from the initial level of 32.6°C down to 32.2°C at the 41st min of total cryoexposure time (TCT) ($p < 0.05$). Internal body temperature has remained in the range of homeostatic values. Response of hemodynamic indices to the cryotherapy session reveals in increasing the systolic blood pressure in average by 9 mm Hg and diastolic blood pressure by 4 mm Hg, heart rate decreases by (13 ± 2) 1/min, as a result of the course a blood pressure is optimized. Cryotherapy is of optimizing effect on respiratory function which is manifested in the growth of maximum lungs' ventilation in men (105 ± 9) to (128 ± 9) l/min, in women they were (75 ± 4) to (81 ± 5) l/min ($p < 0.05$). Cryotherapy course increases the values of RMSSD and rNN50 heart rate variability and reduces the values of cardiac pacemaker, load index and congenital malformations ($p < 0.05$), indicating an increased activity of independent regulation loop and decreased activity of the central regulation loop. Indices of the regulatory systems activity decreased in men (2.1 ± 0.3) to (1.8 ± 0.7) , and in women they made (2.2 ± 0.2) to (1.6 ± 0.5) ($p < 0.05$), testifying to the reduction of regulatory systems straining. The course results in the decrease of cortisol level in blood serum from the initial values (436 ± 26) down to (365 ± 31) nmol/l in the period from the 31st to 80th min of TCT ($p < 0.05$). As a result of cryotherapy the rates of visual-motor responses are optimized, muscular strength and muscular endurance are increased, the indices of chronaxia and biological age are reduced, health is improved, activity, the mood of the patients are increased, psychological state is normalized ($p < 0.05$).

Thus, cryoextreme therapy is a stress exposure going-out beyond the adaptation norm limits and inducing psychophysiological changes in various systems of human organism. Response of organism's systems to cryoexposure is a model of psychophysiological stress, the parameters of which are evaluated by some presented psychophysiological and biophysical indices.

Стволовые клетки и иммунные реакции организма

Н.И. Лисяный

Институт нейрохирургии АМН Украины, г. Киев

Stem Cells and Organism Immune Responses

N.I. LISYANYI

*Institute of Neurosurgery named after Acad. A.P. Romodanov
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*

Стволовые клетки и клетки-прогениторы широко внедряются в клиническую практику. В последние годы наряду с традиционными регенеративно-заместительными, интенсивно изучаются ранее неизвестные свойства стволовых клеток: иммуносупрессивные, индукторные, опухолестимулирующие и трансдифференцировочные, которые существенно могут расширить или ограничить область их применения.

Особый интерес среди известных типов стволовых и прогениторных клеток представляют мезенхимальные стволовые клетки взрослых особей, получаемые из костного мозга и жировой ткани, что связано с доступностью этих тканей и возможностью получения аутологичных клеток, которые не подвержены реакции отторжения. Для этих клеток характерны широкий трансдифференцировочный спектр и высокая иммуносупрессивная активность, о чем свидетельствуют результаты многочисленных работ.

Известно, что иммуносупрессивные свойства мезенхимальных стволовых клеток реализуются за счет минимум двух механизмов: прямого межклеточного взаимодействия и непрямого, связанного с синтезом целого каскада цитокинов и хемокинов, среди которых основными являются ИЛ-10, NO, ИДО, простагландин E-2. Выделение указанных цитокинов и иммуносупрессивных факторов осуществляется после контакта с иммунными клетками организма, и они направлены на блокирование различных этапов иммунного ответа. Прямое взаимодействие, возможно, реализуется за счет экспрессии супрессивной молекулы HLA-1 G, обладающей способностью блокировать активность НК и T-цитотоксических клеток. Проведенные нами исследования показывают, что помимо иммуносупрессивного действия мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани обладают и антирегенеративной активностью, тормозят заживление кожных ран у крыс. Это позволяет предполагать, что супрессивные свойства стволовых клеток более широкие, чем иммуносупрессивные, по-видимому, им характерна антипролиферативная активность в широком смысле.

Таким образом, достаточно сложные взаимодействия стволовых клеток с иммунной системой зависят от их функционального состояния, которое можно разделить на 3 стадии: неактивную, стимулированную (активную), трансформирующую [Лисяный Н.И., 2012]. Первым двум стадиям свойственны иммуносупрессивные свойства, третьей – приобретение антигенности и потеря супрессивных свойств.

Выяснение механизмов взаимодействия стволовых клеток с иммунной системой организма важно как для понимания их природы, так и для более четкого определения показаний к клиническому применению.

Stem cells and their progenitors are widely introduced into clinical practice. Recently, along with the traditional regenerative-substitutive properties of stem cells, previously unknown ones such as: immunosuppressive, inductive, tumor-stimulating, transdifferentiating, capable to significantly expand or limit their application area have been intensively studied.

Mesenchymal adult stem cells derived from bone marrow and adipose tissue, associated with availability of these tissues and probability of autological cell derivation, unexposed to rejection are of special interest among the known types of stem and progenitor cells. A wide transdifferentiating range and a high immunosuppressive activity, as shown by numerous studies are characteristic for these cells.

It is known that immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells are implemented due to at least two mechanisms as: direct and indirect cell-cell interactions, associated with the synthesis of cascade of cytokines and chemokines, the main of which are IL10, NO, IDO, prostaglandin E-2. Derivation of these cytokines and immunosuppressive factors are after the contact with immune cells in an organism, and they are directed to block various stages of immune response. Direct interaction may be implemented by expressing suppressive molecule HLA-1 G, capable to block the activity of NK and T-cytotoxic cells. The performed studies show that except immunosuppressive action the mesenchymal stem cells of adipose tissues have antiregenerative activity, inhibit the healing of rat skin wounds. This allows to suggest that suppressive properties of stem cells are more extensive than immunosuppressive ones, apparently, they are characterized by antiproliferative activity in an extended sense.

Thus, rather complex interactions of stem cells with the immune system depend on their functional state, which can be divided into 3 stages: inactive, stimulated (active), transforming [Lisyanyj N.I., 2012]. To the first two stages the immunosuppressive properties are characteristic, to third one an antigenicity gaining and loss of suppressive properties are done.

Elucidation of mechanisms of stem cell interaction with immune system of an organism is important both to implement their nature and more accurately determine the indications for clinical use.

Криоконсервирование эмбрионов человека с позиции биоэтики

Ф.В. ДАХНО, А.О. КУЦЕНКО

Институт репродуктивной медицины, г. Киев

Cryopreservation of Human Embryos From Position of Bioethics

F.V. DAKHNO, A.O. KUTSENKO

Institute of Reproductive Medicine, Kiev, Ukraine

Криоконсервирование эмбрионов человека – сложный вопрос с точки зрения биоэтики, поскольку важно решить судьбу человеческих эмбрионов, полученных при проведении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Избыток эмбрионов человека – неизбежное следствие рутинной программы IVF. Контролируемая стимуляция яичников (КСЯ) предотвращает атрезию фолликулов и «спасает» ооциты, что позволяет получить много эмбрионов. Для безопасности (многоплодия) только ограниченное число эмбрионов (не более трех) может быть перенесено в матку в течение «свежего» цикла. Почти во всех центрах ВРТ оставшиеся эмбрионы криоконсервируют для более позднего использования.

Важно определить судьбу оставшихся эмбрионов. Мы предлагаем перед иницированием лечения или замораживанием эмбрионов оформлять письменное добровольное информированное согласие между возможными родителями и клиникой, в которой проводится ВРТ, относительно криоэмбрионов. При этом пациенты имеют право решать судьбу их генетического материала и совместно с клиникой вопросы репродукции: предлагают выбрать следующий вариант: перенос эмбрионов в пределах родительского проекта; разрешение на использование эмбрионов для донации другим реципиентам; согласие на использование эмбрионов для исследования; донация партнеру для ЭТ в случае смерти одного из супругов; разрешение клинике распоряжаться судьбой эмбрионов.

Продукция спермиев в яичках, как и созревание ооцитов в яичниках, после химио- и лучевой терапии могут быть полностью блокированы. Мужчина, которому планируется проведение химио- и лучевой терапии, при хранении спермы в криобанке имеет реальный шанс в дальнейшем иметь своего собственного генетического ребенка. Методика гетеротропной трансплантации криоконсервированной овариальной ткани применяется для лечения бесплодия у пациенток, радикально излеченных от таких заболеваний, как лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы, лейкозы, опухолевые процессы. К 2011 году родились 9 детей в результате гетеротропной трансплантации овариальной ткани. Мы начали изучение этой проблемы и надеемся на положительные результаты.

Cryopreservation of human embryos is a complex task in terms of bioethics, whereas it is important to decide the fate of human embryos obtained during assisted reproductive technology (ART). Surplus of human embryos is an inevitable consequence of IVF routine program. Controlled ovarian stimulation (COS) prevents follicular atresia and ‘rescues’ oocytes allowing to get a lot of embryos. For safe pregnancy (case of multiple fetuses), only a limited number of embryos (up to three) can be transferred into uterus during a ‘fresh’ cycle. Almost at all the centers of ART the remaining embryos are cryopreserved to be later used.

It is important to determine the fate of remaining embryos. We suggest prior to initiating the treatment or freezing of embryos to write a voluntary informed consent between the possible parents and the Clinic, in which ART is performed, as for cryoembryos. In this case, patients have the right to decide the fate of their genetic material and, together with the clinical reproduction issues: they are offered the following variants to select: embryo transfer within the parent project, authorization to use the embryos for donation to other recipients; consent to use the embryos for research, donation to partner of ET in case of spouse death; the Clinic permission to dispose the fate of embryos.

Sperm production in testes, as well as maturation of oocytes in ovaries after chemo- and radiation therapy may be completely blocked. A man who is planned for chemo- and radiation therapy, during storage of sperm at the Cryobank has a real chance to have their own genetic child in the future. Methods of heterotropic transplantation of cryopreserved ovarian tissue is used to treat infertility in women, drastically cured from the diseases such as: Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, leukemia, cancer. By 2011, nine children were born due to heterotopic transplantation of ovarian tissue. We began to study this problem and look forward for positive results.