

С.В. Спиридонов¹, Н.Н. Щетинко², В.О. Одинцов¹, А.П. Шкет¹, О.А. Юдина²,
С.И. Дрык³, О.И. Солодка², Д.Н. Садовский³, Ю.П. Островский¹

ОПЫТ КРИОКОНСЕРВАЦИИ АОРТАЛЬНЫХ АЛЛОГРАФТОВ В ГУ РНПЦ «КАРДИОЛОГИЯ»

ГУ РНПЦ «Кардиология»¹, УЗ «Городское клиническое
патологоанатомическое бюро»²,
УЗ «9-я городская клиническая больница»³

В статье приведено описание разработки программы криоконсервации, которая обеспечивает охлаждение аортальных аллографтов со скоростью 1°C в минуту до температуры -55°C.

Рассматриваются результаты оценки сохранности структуры аллографта с использованием гистологических и иммуногистохимических методов после размораживания при температуре 8-10°C за один час.

Ключевые слова: криоконсервация, аортальный аллографт.

**S.V. Spiridonau, N.N. Shchatsinka, V.O. Adzintsov, A.P. Shket, O.A. Yudina, S.I. Dryk,
O.I. Solodkaya, D.N. Sadovskiy, Y.P. Ostrovskiy**

EXPERIENCE OF AORTIC ALLOGRAFTS CRYOPRESERVATION IN THE REPUBLICAN SCIENTIFIC AND PRACTICAL CENTRE "CARDIOLOGY"

In the article we present cryopreservation programme, that enables aortic allograft freezing at a rate 1°C per minute up to -55°C. Results of histologic and immunohistochemic studies of allograft structure after thawing at 8-10°C for one hour are provided.

Key words: cryopreservation, aortic allograft.

Бурное развитие кардиохирургии в 70-е годы XX-го столетия привело к активному использованию аллографтов для коррекции пороков аортального клапана и восходящей аорты. Первые результаты применения аллографтов показали, что они адекватно корригируют внутрисердечную гемодинамику, существенно снижают риск тромбозомболических осложнений, не требуют проведения пожизненной антикоагулянтной терапии и улучшают качество жизни оперированных пациентов. Однако, первые попытки использования аллографтов выявили определённые проблемы:

1. Недостаточно широкая доступность аллографтов и сложность подбора донора, и, как следствие, потребность в создании банка аллографтов;

2. Отсутствие способа длительного хранения нативных клапанов, и, как следствие, необходимость в изобретении методик консервации.

Появление методик криоконсервации, включая программированный метод замораживания, и разработка криопротекторов позволили хранить аллографт в течение длительного времени без изменения его морфологической и биологической структуры, что в дальнейшем дало возможность создать систему тканевых банков.

Безусловно, одним из самых важных этапов создания криоконсервированных аллографтов является непосредственно сам процесс криоконсервации. Основная его цель – это сохранение жизнеспособности ткани (восстановление нормальной функции клеток после их криоконсервации с последующим размораживанием). Вода – основной компонент любой клетки – при криоконсервации превращается в лёд, и метаболизм клетки прекращается. Вместе с тем, образование льда внутри клетки может приводить к ее повреждению. Повреждение клетки при криоконсервации является результатом воздействия двух основных факторов: кристаллизации воды и повышения концентрации оставшегося раствора во внеклеточной среде. При воздействии первого фактора степень повреждения криоконсервированной ткани зависит от количества свободной воды в клетке и межклеточном пространстве и от способности раствора к кристаллизации во время криоконсервации с образованием как внутри, так и вне клетки кристаллов льда, которые могут разрушать ее стенку и органеллы.

Ряд исследований позволили выявить механизмы повреждения клеток при криоконсервации с использованием различных скоростей охлаждения. Некоторыми авторами предлагалась скорость охлаждения 0,1°C в минуту [1]. Считалось, что при медленном охлаждении клетка в состоянии нивелировать потерю воды и поддержать баланс между вне- и внутриклеточной жидкостью. Однако, было доказано, что при медленном охлаждении образуются крупные кристаллы льда как внутри клетки, так и во внеклеточной среде, а повреждение клетки происходит из-за осмотического сморщивания. Время осмотического шока при этом оказывалось весьма продолжительным [2]. Другие исследователи использовали скорость криоконсервации 1,5°C в минуту [3], а некоторые даже скорость 5°C в минуту [4]. Если криоконсервация происходит очень быстро, внеклеточная вода кристаллизуется также очень быстро. Исследование такой скорости охлаждения показало: концентрация солей во внеклеточном пространстве растёт так быстро, что внутриклеточная вода не успевает выйти во внеклеточное пространство и подвергается кристаллизации внутри клетки. Формирование кристаллов льда внутри клетки почти всегда приводит к ее гибели. Поэтому наиболее эффективной скоростью с точки зрения сохранения жизнеспособности клетки является средняя скорость, составляющая 1°C в минуту. Некоторые авторы предлагают на разных этапах криоконсервации использовать различные скорости этого процесса. Так, одни исследователи снижают температуру в ткани до -40°C со скоростью 1°C в минуту, а затем до -80°C со скоростью 5°C в минуту. Другие используют следующую схему: от 5°C до -50°C температуру снижают со скоростью 0,7°C в минуту, выдерживают 5 минут, и затем от -50°C до -80°C температуру снижают со скоростью 1,4°C в минуту. Между погружением ткани аллографта в консервирующую среду и началом криоконсервации должно пройти от 30 до 45 минут. Во время этого периода аллографт не разрешается согреть, так как доказано, что воздействие тепла на человеческие фибробласты может оказывать отрицательное воздействие на их жизнеспособность после размораживания [5].

В связи с вышеизложенным, нами было проведено исследование, направленное на создание оптимальной программы криоконсервации аортальных аллографтов с последующей оценкой их гистологических свойств.

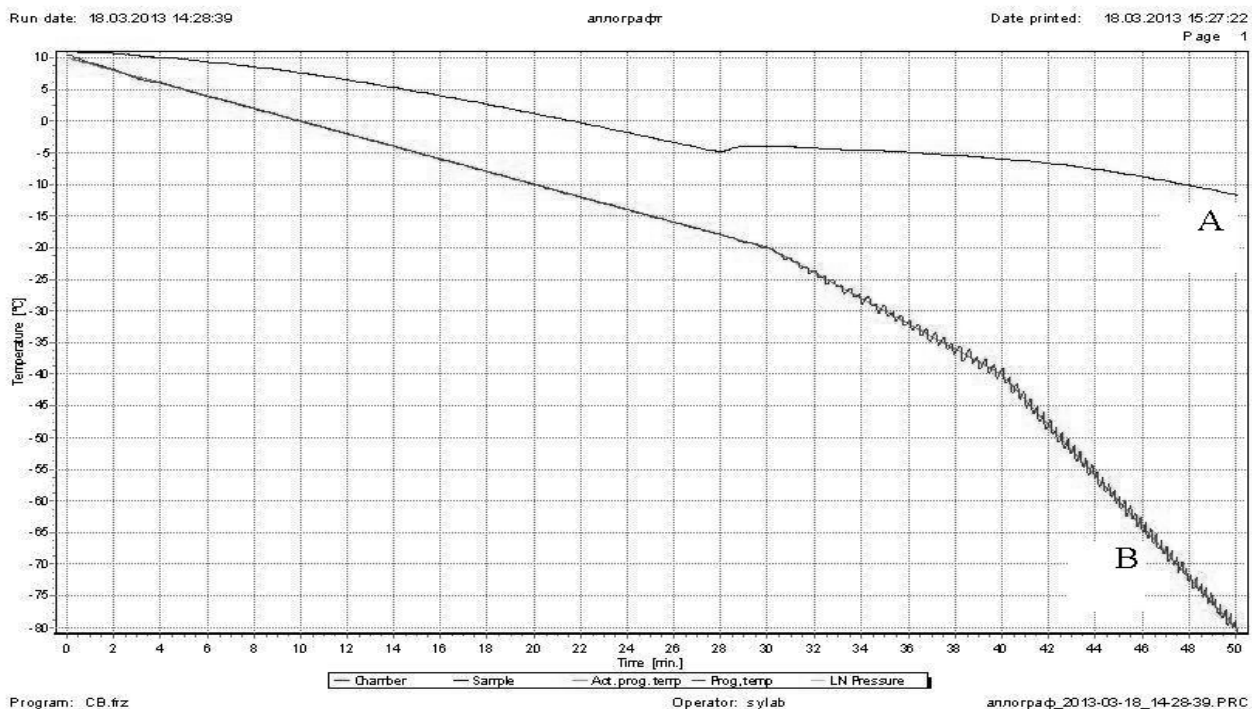


Рис. 1. График снижения температуры при охлаждении содержимого контейнера со скоростью 1°C. Кривая A – температура в образце; кривая B – температура в камере.

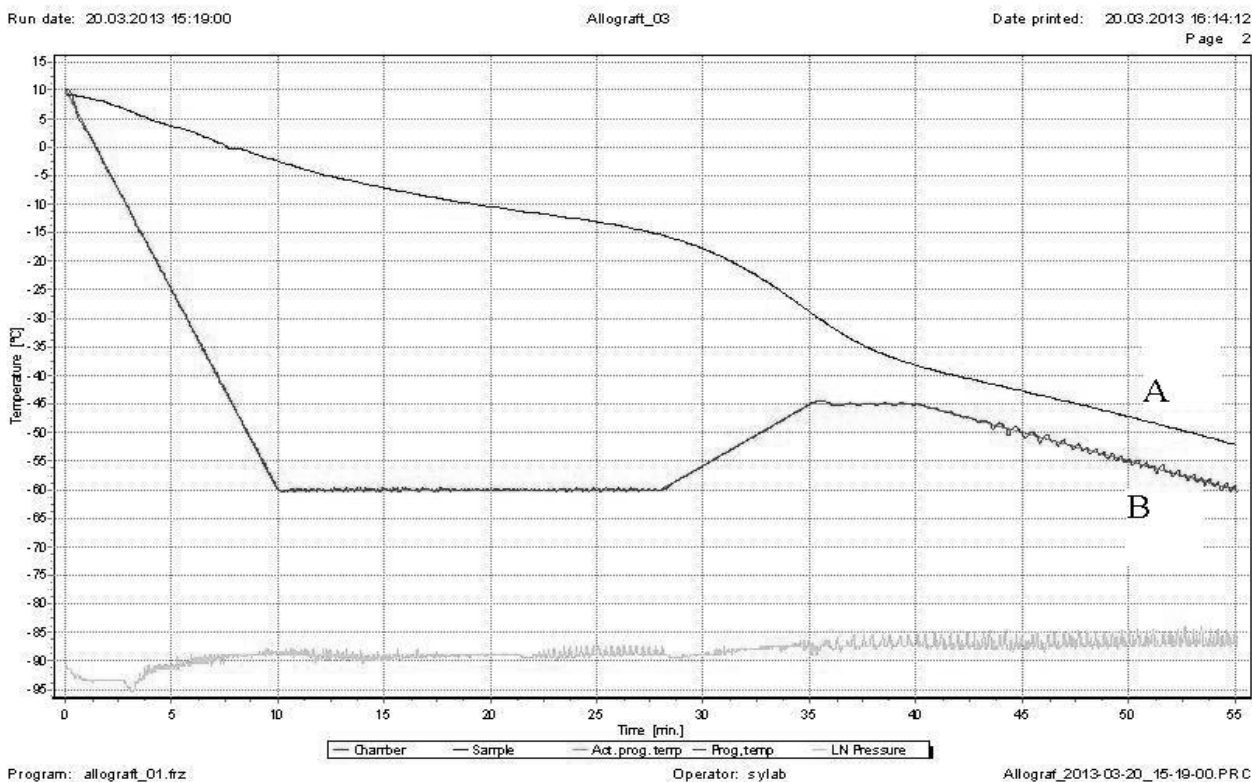


Рис. 2. График снижения температуры при охлаждении содержимого контейнера по предложенной схеме. Кривая A – температура в образце; кривая B – температура в камере.

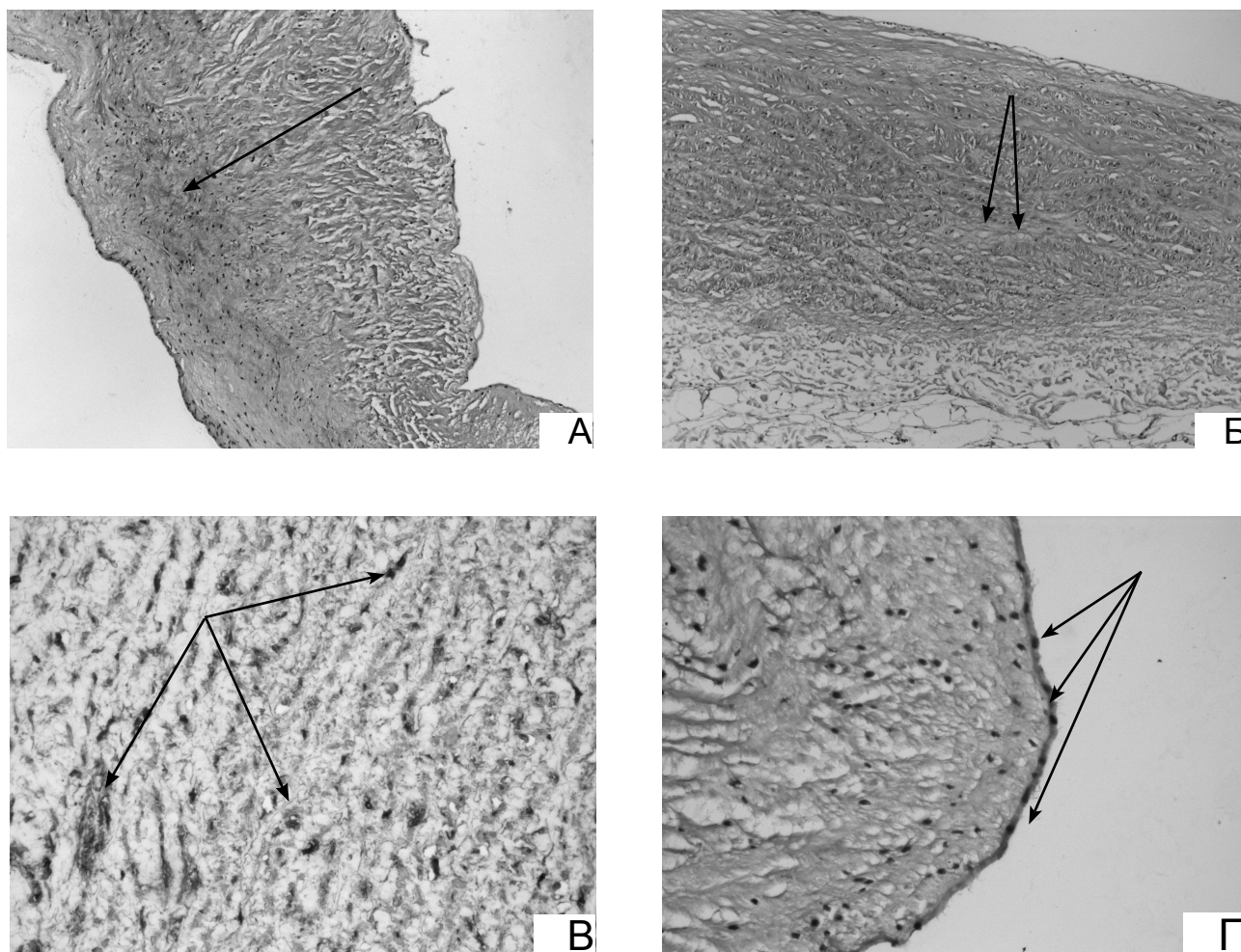


Рис. 3. Микроскопические особенности аллогraftов при использовании разработанной программы криоконсервации: **А** – незначительное расширение спонгиозной зоны свободной заслонки АоК; **Б** – незначимое увеличение объема экстрацеллюлярного матрикса в меди артериального слоя; **В** – сохранность гладкомышечных клеток в меди артериального слоя; **Г** – сохранность эндотелиальных клеток в краевой зоне свободной заслонки АоК.

Цель исследования. Создать программу криоконсервации, обеспечивающую охлаждение аортальных аллогraftов со скоростью 1°C в минуту до температуры -55°C с оценкой сохранности структуры аллогraftа с использованием гистологических и иммуногистохимических методов после размораживания при температуре $8-10^{\circ}\text{C}$ за один час.

Материал и методы

В исследование были включены 10 аллогraftов аортального клапана. 2 клапана были эксплантированы у доноров с документированной смертью головного мозга во время мультиорганного забора, 8 – от трупов в первые 12 часов после биологической смерти. Стерилизация аллогraftов проводилась в растворе, содержащем 175,0 мл питательной среды RPMI 1640, 0,5 грамма цефазолина, 20,0 мл 0,5%-го раствора метронидазола и 50,0 мл 0,2%-го раствора флуконазола. Все аллогraftы помещались в указанный раствор на 24 часа при температуре 4°C . Нами использовался следующий состав среды для криоконсервации: 160 мл питательной среды RPMI 1640, 20 мл 10%-го раствора человеческого альбумина, 20 мл 10%-го раствора диметилсульфоксида.

Для измерения температуры внутри аллогraftа, находящегося в растворе для криоконсервации в специальном запаянном пакете фирмы «Fresenius Kabi», в геометрический центр аллогraftа устанавливался датчик температуры.

Криоконсервацию аортальных аллогraftов проводили в аппарате для криоконсервации «ICE CUBE 15M» фирмы

«SY-LAB Gerate G.m.b.H.» (Австрия). Для криоконсервации аллогraftов мы использовали скорость охлаждения 1°C в минуту. Размораживание аллогraftов происходило при температуре $8-10^{\circ}\text{C}$ за один час (модификация РНПЦ «Кардиология») [6].

Для оценки эффективности предложенной нами программы криоконсервации были проведены гистологические исследования аллогraftов, подвергшихся криоконсервации и размораживанию в течении 1 часа при температуре $8-10^{\circ}\text{C}$.

Морфологически исследованы 10 аллогraftов. Из каждого аллогraftа по стандартной схеме вырезали 6 фрагментов, включающих аорту, артериальный слой синуса Вальсальвы, зону соединения со свободной заслонкой аортального клапана и собственно свободную заслонку коронарных (2) и некоронарного синусов.

Образцы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в среду «Гистамикс». Срезы толщиной 4 мк окрашивали гематоксилином и эозином, орсеином по Харту (для выявления эластических волокон), MSB (для выявления очагов повреждения), альциановым синим (для выявления кислых гликозаминогликанов).

Выполнялось иммуногистохимическое исследование с антителом анти- α -сма (для маркировки гладкомышечных клеток). Для иммуногистохимического окрашивания также использовали срезы толщиной 4 мкм. В качестве базо-

Таблица 1. Сравнительная количественная характеристика клеточного состава анатомических структур аллогraftов (по результатам морфометрического анализа).

Вид и локализация клеточных структур	Количество в мм ²		Достоверность
	Контроль	Опыт	
Гладкомышечные клетки в артериальном слое	992±133	881±74	P<0,52
Фибробласты в свободной заслонке Аок	855±90	586±121	P<0,11
Фибробласты в спонгиозной зоне синуса Вальсальвы	594±50	635±48	P<0,57
Эндотелиоциты сосудистой стенки артериального слоя (на мм длины)	15±0,9	19±1,9	P<0,08
Эндотелиоциты свободной заслонки (на мм длины)	28±1,7	20±1,7	P<0,02

вого применяли 0,05М Трис-буфер (рН 7,4) с добавлением сапонина (0,01%). Срезы депарафинизировали в ксилоле и затем регидратировали в батарее спиртов нисходящей концентрации, после чего промывали в дистиллированной воде. Демаскировку антигенов проводили в СВЧ-печи в течение 7 минут при 800W, а затем 15 минут при 400W. В качестве демаскировочных использовали буферы с рН 6,0 и 9,0. Эндогенную пероксидазу блокировали 3%-ым раствором пероксида водорода в течение 20 минут. С целью блокирования неспецифического связывания антител на срезы на 30 минут наносили 1% раствор бычьего сывороточного альбумина. Инкубацию с первичным антителом производили в течение 30 минут. В качестве визуализирующей системы применяли EnVision (DacoCytomation), в качестве хромогена – диаминобензидин (DacoCytomation) в концентрации 1мг/мл с добавлением пероксида водорода (0,02%-го раствора). Препараты помещали в ксилол на 1 минуту, докрашивали гематоксилином Майера (Sigma) и заключали в «канадский бальзам». Перед окраской препаратов, вошедших в исследование, проводилась отработка иммуногистохимической окраски с подбором оптимального разведения первичных антител и режима демаскировки антигенов.

Результаты и обсуждение

При охлаждении камеры со скоростью 1°C в минуту до температуры -55°C температура содержимого контейнера не соответствовала изменению температуры охлаждающей камеры. Так, при охлаждении содержимого контейнера со скоростью 1°C в минуту нами был получен следующий показатель снижения температуры в аллогraftе (Рисунок 1).

При снижении температуры в камере до -40°C за 40 минут температура в аллогraftе снизилась всего лишь до -6°C. Объяснение данному факту, а также более медленному охлаждению аллогraftа по сравнению с уменьшением температуры в камере кроется в выделении латентного тепла при кристаллизации воды. Когда среда для криоконсервации начинает замораживаться, установленная программа должна компенсировать тепло, выделяющееся в процессе кристаллизации воды. Нашим коллективом предложен следующий режим (программа) криоконсервации (Рисунок 2).

Для компенсации выделения латентного тепла при кристаллизации воды температура в камере охлаждения должна быстро снизиться за 10 минут до температуры -60°C, с последующим поддержанием данной температуры в течение 18 минут. Такое быстрое охлаждение позволяет ткани аллогraftа устойчиво охлаждаться со скоростью -1°C в минуту, избегая эффекта колебания температуры, который приводит к повреждению клеток. Когда температура ткани аллогraftа достигнет -20°C, большинство воды вне клетки будет в кристаллизованном состоянии (тепло кристаллизации уже будет высвобождено), и температура ткани будет резко снижаться. Для поддержания скорости замораживания в аллогraftе -1°C в минуту температура в камере должна увеличиться.

Это достигается путем согревания камеры до температуры -45°C в течение 7 минут и поддержания ее на этом уровне в течение 5 минут. Начиная с этой точки, температура в камере и в ткани аллогraftа начнет снижаться параллельно до температуры -55°C.

После охлаждения до температуры -55°C пакет с аллогraftом переносится в сосуд Дюара для хранения в парах жидкого азота. Хранение аортальных аллогraftов в парах жидкого азота при температуре -150°C является оптимальным, так как обеспечивает целостность, прочность аллогraftов и сохранность их гистологической структуры. [7].

Размораживание аллогraftов проводилось при температуре 8-10°C за 1 час.

При микроскопическом исследовании срезов всех образцов, подвергшихся криоконсервации с использованием предложенной нами программы, по сравнению с нативными (не подвергшимися криоконсервации, хранению и размораживанию), выявлены минимальные структурные, качественные и количественные изменения. В свободном крае заслонки аортального клапана (Аок) отмечалось незначительное расширение спонгиозной зоны без нарушения соотношения и пространственной ориентации коллагеновых и эластических волокон, а также фибробластов (Рисунок 3А). В артериальном слое синуса Вальсальвы – незначительное увеличение объема кислых гликозаминогликанов без структурной деформации интимы и меди (Рисунок 3Б). Эндотелий во всех анатомических отделах образцов оставался сохранным на всем протяжении (Рисунок 3Г). Гладкомышечные клетки во всех исследованных структурах аллогraftа сохраняли свои качественные и количественные характеристики (Рисунок 3В).

Морфометрическое исследование демонстрирует полную сохранность клеточного матрикса во всех анатомических структурах аллогraftа при использовании предложенной программы криоконсервации. Сравнительная количественная характеристика сохраненных фибробластов, гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов представлена в Таблице 1.

Таким образом, использование разработанной нами программы криоконсервации (температура в камере снижается за 10 минут до -60°C, в последующем поддерживается таковой в течение 18 минут, затем осуществляется согревание камеры до температуры -45°C в течение 7 минут с поддержанием последней в течение 5 минут. Начиная с этой точки температура в камере и в ткани аллогraftа снижается параллельно до -55°C со скоростью 1°C в минуту) обеспечивает сохранение жизнеспособности и гистологической структуры ткани аллогraftа после криоконсервации и размораживания.

Практические рекомендации:

Не допускается прерывать цикл криоконсервации до достижения температуры -40°C. Прекращение криоконсер-



вазии при температуре -40°C и ниже допустимо без повреждения аллогraftа. Остановка цикла замораживания более чем на 5 минут не допускается.

В конце процесса криоконсервации профиль замораживания должен быть оценен на предмет нахождения графической кривой криоконсервации в допустимых пределах.

Пакеты, используемые для криоконсервации, могут различаться и иметь различную теплопроводность, что может привести к изменениям кривой криоконсервации. Для каждого типа пакетов следует проводить коррекцию программы криоконсервации.

Немалое значение имеет используемый объем среды для криоконсервации. Изменения кривой криоконсервации наблюдались в тех случаях, когда объем среды отличался более чем на 5% [8].

Соотношение ткани аллогraftа и среды для криоконсервации в пакете также важно и может оказывать влияние на процесс криоконсервации. Доказано, что при использовании одной и той же программы криоконсервации аортальные или пульмональные аллогraftы небольшого размера замораживаются быстрее, чем более крупные аортальные аллогraftы. В идеальных условиях аллогraftы различного размера должны подвергаться криоконсервации с использованием различных программ.

Количество пакетов с аллогraftами в замораживающей камере также влияет на процесс криоконсервации. Наши данные говорят о том, что оптимальным является одномоментная криоконсервация только одного пакета, так как при одновременном замораживании даже двух пакетов происходит выделение значительного количества тепла кри-

сталлизации в камере, что не может быть компенсировано стандартной программой.

Необходимо изменять программу криоконсервации при использовании различных камер замораживания. Незначительные изменения в герметичности двери, скорости подачи жидкого азота и т. п. могут приводить к различным результатам криоконсервации. Программа процесса должна быть откалибрована при изменении используемого оборудования.

Литература

1. *Mermet, B, Buch W, Angell W.* Viable heart valve graft-preservation in the frozen state. *Surgical Forum* 1970;21:156.
2. *Farrant, J.* General observations on cell preservation. 1980. *Low temperature Preservation in medicine and Biology.* 1-18.
3. *Armiger, LC, Thompson RW, Strickett MG, Barrat-Boyes EG.* Morphology of heart valves preserved by liquid nitrogen freezing. *Thorax* 1985;40:778-86.
4. *VanDerKamp AWM, Visser WJ, van Dongan JM, Nauta J.* Preservation of aortic heart valves with maintenance of cell viability. *J Surg Res* 1981;30:47.
5. *Cryolife, I.* clinical program 101-Homograft heart valves. 17. 1985. *Marietta, GA, Cryolife, Inc.* Ref Type: Conference Proceeding.
6. *Спиридонов, С.В., Юдина О.А., Шкет А.П., Чеснов Ю.М., Дрык С.И., Одинцов В.О., Щетинко Н.Н., Зуенок Н.Н., Островский Ю.П.* Варианты предимплантационной подготовки криосохраненных аллогraftов. *Новости хирургии.* Том 21, №2/2013. С.76-81.
7. *Спиридонов, С.В., Юдина О.А., Одинцов В.О., Щетинко Н.Н., Дрык С.И., Солодкая О.И., Землянская В.И., Островский Ю.П.* Исследование различных температурных режимов хранения криосохраненных аллогraftов. *Медицинский журнал.* №2 (44)/2013. С.110-112.
8. *Hopkins, R.A.* Cardiac reconstructions with allograft tissues. *New York: Springer-Verlag; 2003.* p. 43.

Поступила 11.10.2013 г.