

С.В. Спиридонов<sup>1</sup>, О.А. Юдина<sup>2</sup>, В.О. Одинцов<sup>1</sup>, Н.Н. Щетинко<sup>1</sup>, С.И. Дрык<sup>3</sup>,  
О.И. Солодкая<sup>2</sup>, В.И. Землянская<sup>3</sup>, Ю.П. Островский<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ ХРАНЕНИЯ КРИСОХРАНЕННЫХ АЛЛОГРАФТОВ

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

В исследование были включены 22 аортальных аллогraftа. После стерилизации аллогraftов проводилась их криоконсервация до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ . Хранение осуществлялось в двух режимах: при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  ( $n=10$ ) или при температуре  $-150^{\circ}\text{C}$  ( $n=12$ ). После размораживания аллогraftы оценивали визуально, проводились гидравлические испытания и гистологические исследования. Полученные данные позволяют утверждать, что хранение аортальных аллогraftов в парах жидкого азота при температуре  $-150^{\circ}\text{C}$  является оптимальным, так как обеспечивает целостность, прочность аллогraftов и сохранность их гистологической структуры. Хранение аллогraftов непосредственно в жидком азоте, хотя и обеспечивает их целостность и прочность, однако оказывает отрицательное влияние на гистологическую структуру, что может негативно сказываться на долговечности аллогraftов.

**Ключевые слова:** криосохраненные аллогraftы, хранение аллогraftов.

**S.V. Spiridonov<sup>1</sup>, O.A. Yudina<sup>2</sup>, V.A. Adzintsov<sup>1</sup>, M.M. Shchatsinka<sup>1</sup>, S.I. Dryk<sup>3</sup>,  
O.I. Solodkaja<sup>2</sup>, V.I. Zemienskaya<sup>3</sup>, Y.P. Ostrovsky<sup>1</sup>**

### THE STUDY OF VARIOUS TEMPERATURE REGIMENS FOR CRYOPRESERVED AORTIC ALLOGRAFTS STORAGE

22 aortic allografts were included in the research. After sterilisation allografts were cryopreserved to the temperature  $-80^{\circ}\text{C}$ . We used two storage regimens: at  $-196^{\circ}\text{C}$  ( $n=10$ ) and at  $-150^{\circ}\text{C}$  ( $n=12$ ). After defrosting we performed visual inspection of allografts, as well as hydraulic and histological tests. Our results show that optimal storage regimen for aortic allografts is in pairs of liquid nitrogen at temperature  $-150^{\circ}\text{C}$ . Such regimen provides allograft integrity, durability and preservation of its histological structure. At the same time, storage of aortic allografts by immersing them in liquid nitrogen provides allograft integrity and durability, but negatively influence on its histological structure, which can affect long-term durability.

**Key words:** cryopreserved allografts, allografts storage.

Первые упоминания об успешном использовании аллогraftов относятся к 1956 году, когда Мургау имплантировал донорский аортальный клапан в нисходящую аорту пациенту

с недостаточностью аортального клапана [1]. В 1961 году Bigelow имплантировал аллогraft аортального клапана в ортотопическую позицию, однако данная операция закончилась летальным ис-

ходом [2]. В дальнейшем Donald Ross и Brian Barratt-Boes независимо друг от друга доложили о начале клинического использования аортальных аллографтов в ортотопической позиции [3,4]. Бурное развитие кардиохирургии в 70-е годы XX столетия привело к достаточно активному использованию аллографтов для коррекции пороков аортального клапана и восходящей аорты. Первые результаты использования аллографтов показали, что они адекватно корректируют внутрисердечную гемодинамику, существенно снижают риск тромбозомболических осложнений, не требуют проведения пожизненной антикоагулянтной терапии, улучшают качество жизни оперированных пациентов. Однако, после первой эйфории, связанной, как считалось ранее, с появлением идеального материала для реконструкции клапанов сердца, стало появляться множество вопросов. Проблема формирования кальциноза – основного препятствия на пути применения аллографтов, а также невыясненные вопросы иммунологии аллографтов, отсутствие четкого перечня показаний и противопоказаний к их применению, особенности технологии изготовления аллографтов, техники их хирургической имплантации – вот целый комплекс невыясненных вопросов, возникших в результате анализа многолетнего клинического опыта использования аллографтов. Таким образом, требуется проведение дополнительных исследований, направленных на изучение физиологических, иммунологических, биофизических, биомеханических, гистологических характеристик аллографтов на основных этапах их забора, изготовления, хранения, подготовки к имплантации и дальнейшего функционирования после имплантации.

Протокол изготовления криосохраненных аллографтов состоит из множества разделов:

1. Выбор донора;
2. Забор сердца;
3. Транспортировка сердца или аллографта;
4. Выделение аллографта;
5. Оценка аллографта;
6. Стерилизация аллографта;
7. Криоконсервация аллографта;
8. Хранение;
9. Транспортировка аллографта в операционную;
10. Размораживание и отмывание от криопротектанта;
11. Имплантация аллографта.

Криоконсервация аллографтов осуществляется путем строго замораживания с использованием криопротектанта диметилсульфоксида со скоростью 1 градус Цельсия в минуту до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$ . После этого пакет с аллографтом переносится непосредственно в хранилище с жидким азотом, где и осуществляется хранение аллографтов.

Исследования процессов криосохранения аллографтов в основном были направлены на изучение процессов замораживания, выбора криопротектанта, его концентрации. Однако, процессы хранения изучались в меньшей степени. Одним из вопросов является температурный диапазон, в пределах которого хранение оказывает наименьшее повреждающее влияние на аллографт. Благодаря исследованиям, направленным на изучение процессов, происходящих в клетке при замораживании, стало развиваться новое направление в науке, получившее название криобиология. Так, было выяснено, что при заморозке аллографта со скоростью 1 градус в минуту образуются кристаллы льда маленького размера. Термодинамически кристаллы меньшего диаметра менее стабильны, чем кристаллы большего диаметра, так как они имеют большую поверхность [5]. Поэтому, для образования более устойчивой системы, кристаллы меньшего диаметра сливаются в кристаллы большего диаметра – этот процесс получил название макрокристаллизации. Макрокристаллизацию в случае согревания тканей называют рекристаллизацией. По мнению В. Groot, макрокристаллизация бывает трех типов [6]:

1. Быстрая рекристаллизация: процесс, при котором кристаллы льда быстро увеличиваются в объеме во время медленного согревания.
2. Мигрирующая рекристаллизация: процесс, при котором образуются большие кристаллы из маленьких во время постепен-

ного процесса согревания до тех пор, пока не будет достигнута точка таяния льда.

3. Спонтанная рекристаллизация: встречается во время быстрого охлаждения, когда латентное тепло высвобождается во время заморозки и не рассеивается достаточно быстро для предотвращения локального роста температуры, который инициирует рекристаллизацию на ограниченном участке.

D. Pegg доказал, что рекристаллизация обычно происходит при температуре  $-123^{\circ}\text{C}$  [7]. Таким образом, при хранении аллографтов уровень температуры должен поддерживаться ниже  $-130^{\circ}\text{C}$ . При повышении температуры выше  $-130^{\circ}\text{C}$  возможно слияние кристаллов льда в клетке с образованием кристаллов большего диаметра и разрывом клетки, и, как следствие, потерей жизнеспособности. Поэтому колебаний температуры выше  $-130^{\circ}\text{C}$  следует избегать [8].

Также хорошо известно, что внутриклеточный лед может воздействовать на внеклеточный лед через поры и клеточную мембрану, влияя на клеточную жизнеспособность [9].

Исследования нижнего предела температурного режима не так однозначны. Многими авторами считается, что повреждение криосохраненных аллографтов возможно, когда замороженная ткань погружается непосредственно в жидкий азот [10,11], а также при случайном попадании жидкого азота на криосохраненный аллографт [12]. Поэтому рекомендуется хранение аллографтов в парах жидкого азота при температуре от  $-140^{\circ}\text{C}$  до  $-160^{\circ}\text{C}$  [11]. Ряд других исследователей рекомендуют хранение в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  [13]. Некоторые авторы рекомендуют хранение в жидком азоте, однако указывают температурный диапазон от  $-150^{\circ}\text{C}$  до  $-196^{\circ}\text{C}$  [14].

Учитывая вышеизложенное, нами было проведено исследование влияния различных режимов хранения криосохраненных аллографтов на их качественные характеристики и гистологическую структуру.

**Цель исследования.** Оценить воздействие на криосохраненные аллографты различных температурных режимов (пары жидкого азота, жидкий азот) хранения.

#### **Материал и методы**

Данное исследование одобрено этическим комитетом ГУ РНПЦ «Кардиология» № 4а от 21 февраля 2012 года. В исследование были включены 22 криосохраненных аортальных аллографта: 12 были изъяты у доноров во время мультиорганного забора, а еще 10 – у трупов в первые 12 часов после смерти в асептических условиях. Стерилизация аллографтов проводилась в растворе, содержащем 175,0 мл питательной среды «RPMI 1640», 0,5 грамма цефазолина, 20,0 мл 0,5% метронидазола и 50,0 мл 0,2% флуконазола. Все аллографты находились в указанном растворе в течение 24 часов при  $4^{\circ}\text{C}$ . Замораживание осуществлялось с использованием криопротектанта диметилсульфоксида со скоростью 1 градус Цельсия в минуту до температуры  $-80^{\circ}\text{C}$  на программном замораживателе «Планер Биомед». Раствор для криоконсервации состоял из 160 мл питательной среды «RPMI 1640», 20 мл диметилсульфоксида и 20 мл 10% человеческого альбумина. Криоконсервация и хранение осуществлялись в предназначенных для этого специальных пакетах фирмы «Fresenius Kabi». После замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  пакеты доставлялись в хранилище с жидким азотом фирмы «Thermo Scientific».

Хранение осуществлялось в двух режимах в течение 4 суток:

1. При температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  непосредственно в жидком азоте ( $n=10$ ).
2. При температуре  $-150^{\circ}\text{C}$  в парах жидкого азота на 20 см выше уровня жидкой части ( $n=12$ ).

Размораживание проводилось при температуре  $8-10^{\circ}\text{C}$  за 1 час.

Процесс удаления криопротектанта из размороженного аллографта проводился в три этапа с постепенным уменьшением его концентрации. После извлечения аллографта из пакета последний погружался в отмывающий раствор №1 на 5 минут. Раствор №1 содержал 200 мл питательной среды «RPMI 1640» и 10 мл диметилсульфоксида. Затем аллографт помещался в отмывающий раствор №2 также на 5 минут. Отмывающий раствор №2 со-

держал 200 мл питательной среды «RPMI 1640» и 5 мл диметилсульфоксида.

Размороженные аллографты оценивали визуально, также проводились гидравлические испытания и гистологические исследования.

**Визуальная оценка** заключалась в оценке диаметра, конфигурации, консистенции, а также наличия трещин в стенке и створках аллографта.

**Гидравлические испытания** проводили путем нагнетания физиологического раствора в просвет аллографта, в котором дистальный конец и устья коронарных артерий были ушиты нитью пролен 3/0. Нагнетание и измерение давления подачи жидкости в мм.рт.ст. осуществлялось с помощью присоединенного аппарата «C-Fusor» фирмы «Medex.inc» (Ohio, USA). Нагнетание жидкости проводили до тех пор, пока не появлялись признаки недостаточности клапана.

**Для гистологического исследования** отбирали участки стенки аллографтов на уровне синусов Вальсальвы ниже линии синотубулярного соединения, а также полунные заслонки клапанов. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

### Результаты и обсуждение

**Визуальный контроль:** диаметр и конфигурация аллографтов оставались прежними после размораживания в сравнении как с исходными образцами, так и с образцами, подвергнутыми хранению в различных режимах. Размороженные аллографты имели плотную консистенцию при различных режимах хранения. Таким образом, на основании макроскопической оценки можно заключить, что хранение аллографтов в парах азота или непосредственно в жидком азоте не приводит к появлению макроскопических изменений.

**Гидравлические испытания.** У всех аллографтов, независимо от режима хранения, были документированы хорошие прочностные характеристики, превышающие в несколько раз их физиологические пределы. Так, аортальные аллографты выдерживали давление до  $502 \pm 84$  мм. рт. ст. На основании проведенных испытаний можно утверждать, что различные режимы хранения не оказывают негативного влияния на прочностные характеристики аортальных аллографтов.

**Гистологические исследования.** При хранении аллографтов в течение 4 суток в парах жидкого азота ( $n=12$ ) с последующим размораживанием при температуре  $8-10^\circ\text{C}$  не было выявлено изменений гистологической структуры аллографтов по сравнению с нативными клапанами (не подвергавшимися криосохранению и размораживанию).

При хранении аллографтов в течение 4 суток непосредственно в жидком азоте ( $n=10$ ) с последующим размораживанием аллографтов при температуре  $8-10^\circ\text{C}$  наблюдается расширение спонгиозной зоны **свободной створки**, нарушение соотношения и ориентировки коллагеновых волокон в краевой зоне: укорочение, потеря кучности, фрагментация (рис.1).

Сходные изменения также были характерны для **артериального слоя синуса Вальсальвы, где в меди** был выражен миксоматоз, коллагеновые волокна были гомогенизированы, а гладкомышечные клетки – с глыбчатым цитоллизом (рис. 2).

Деструктивные изменения коснулись и **интимы артериального слоя:** во всех исследованных аллографтах наблюдали деэндотелизацию с сохранением эндотелия лишь на небольшом протяжении интимы. В части образцов эндотелиальные клетки артериального слоя были набухшие, с чешуйчатым расположением,

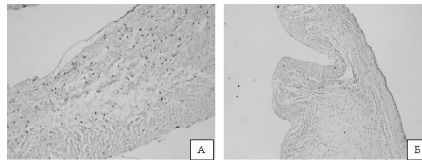


Рисунок 1. Изменения свободной створки полунной заслонки: А – исходный образец; Б – расширение спонгиозной зоны при хранении в жидком азоте.

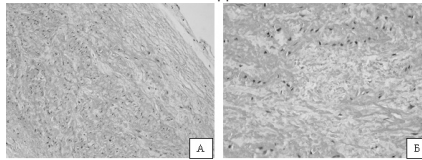


Рисунок 2. Изменение артериального слоя при хранении в жидком азоте: А – миксоматоз; Б – глыбчатый цитоллиз миоцитов.

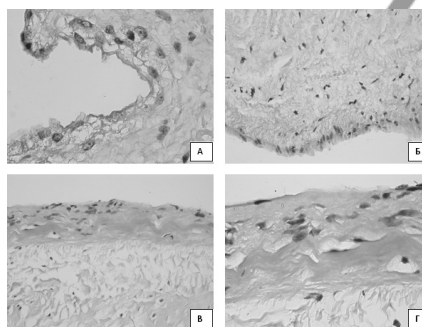


Рисунок 3. Изменения эндотелия и эластической мембраны при хранении в жидком азоте: А – набухшие эндотелиоциты; Б – эндотелиоциты с чешуйчатым расположением; В, Г – деструкция и фибриноидное набухание эластической мембраны.

симулирующим многорядность с нарушением полярности клеток в виде «заборчика». В единичных полях зрения эндотелиальные клетки – с кариопикнозом и кариорексисом. **Эластическая мембрана артериального слоя** в большинстве полей зрения была разрушена totally, ее эластические волокна – гомогенизированы, с фибриноидным набуханием и выраженной эозинофилией (рис. 3).

Выявленные морфологические изменения со стороны свободных створок в последующем могут приводить к замещению спонгиозного слоя соединительной тканью с потерей их подвижности и формированием функциональной недостаточности. Склерозированные полулуния так же как и медиа артериального слоя могут стать матрицей для дистрофического кальциноза, что, в свою очередь, может приводить к дисфункции аллографта.

Другим аспектом отдаленного использования таких аллографтов является вероятность септических и тромбоземболических осложнений, в патогенезе которых непосредственная роль принадлежит повреждению эндотелия свободной створки клапана и интимы артериального слоя.

Таким образом, хранение аортальных аллографтов в парах жидкого азота при температуре  $-150^\circ\text{C}$  является оптимальным, так как обеспечивает целостность, прочность аллографтов и сохранность их гистологической структуры. Хранение аллографтов непосредственно в жидком азоте, хотя и обеспечивает их целостность и прочность, однако оказывает отрицательное влияние на гистологическую структуру, что может негативно сказываться на долговечности аллографтов.

### Литература

- Murray, G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956;7:466-471.
- Gunning, A. Comments on Ross first homograft replacement of the aortic valve (letter to the editor). *Ann. Thorac. Surg* 1992;54:809-810.
- Ross, DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet* 1962;2:487.
- Barratt-Boyes, BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964;19:131-150.
- Karow, A.M. Pegg D.E. Organ preservation for transplantation. New York Marcel Dekker 1981.
- Grout, BWW, Morris GJ. Effect of Low temperatures on biological systems. London: Edward Arnold 1987.
- The history and principles of cryopreservation. D. Pegg [et al.] // *J Thorac Cardiovasc Surg* – 2002. - Vol. 20. – P. 5-13.
- Murray, G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. *Angiology* 1956;7:466-471.
- Watkins, C. University of Chicago Hospital Heart Valver Program. Lange PE. 1988. Personal Communication.
- Barratt-Boyes, BG. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. *Thorax* 1964;19:131-150.
- Бритиков, Д.В. «Организация производства аллографтов, опыт их клинического применения в НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева и основные направления развития». Медицинские науки, М., 2004, №1, с.10-17.
- Wassenaar, C, Wijsmuller EG, Van Herwerden LA, Aghai Z, Van Tricht CLJ, Bos E : Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing. *Ann Thorac Surg* 60 : S165 -167, 1995
- McNally Method for cryopreserving heart valves: United States Patent № 4890457 or 02.01.1990.
- Can Vuran, Paul Simon, Gregor Wollenek, Emre Ozker, Erdal Aslim. Midterm Results of aortic valve replacement with cryopreserved homografts. - 2012. - Vol. 29. – P. 170-173.

Поступила 12.01.2013 г.