

С.В. СПИРИДОНОВ¹, О.А. ЮДИНА², А.П. ШКЕТ¹, Ю.М. ЧЕСНОВ¹,
С.И. ДРЫК³, О.В. ОДИНЦОВ¹, Н.Н. ЩЕТИНКО¹, Н.Н. ЗУЕНОК³,
Ю.П. ОСТРОВСКИЙ^{1,4}

ВАРИАНТЫ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ КРИСОХРАНЕННЫХ АЛЛОГРАФТОВ

ГУ РНПЦ «Кардиология»¹,
УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»²,
УЗ «9-я городская клиническая больница»³,
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»⁴,
Республика Беларусь

Цель. Оптимизировать режим размораживания криосохраненных аллографтов.

Материал и методы. В исследование были включены 27 криосохраненных аллографтов аортальных и пульмональных клапанов. Стерилизация аллографтов проводилась в растворе антибиотиков, содержащем питательную среду, цефазолин, метронидазол, флуконазол. Криоконсервация осуществлялась на программном замораживателе со скоростью 1 градус Цельсия в минуту до температуры -80°C. В качестве криопротектанта использовался диметилсульфоксид. Размораживание проводилось в трех режимах: 1) при температуре 36-42°C в течение 15 минут (n=10), 2) при температуре 18-20°C в течение 35 минут (n=7), 3) при температуре 8-10°C в течение 1 часа (n=10) [модификация РНПЦ «Кардиология»]. Удаление криопротектанта осуществлялось с постепенным уменьшением его концентрации.

Результаты. Диаметр и форма аллографтов оставались прежними после процесса размораживания по сравнению с исходными образцами. Размороженные аллографты имели одинаково плотную консистенцию при использовании различных вариантов размораживания. Проведенная макроскопическая оценка позволяет утверждать, что размораживание при температуре 8-10°C не приводит к появлению разрывов в стенке аллографтов. Исследование прочностных характеристик при проведении гидравлических испытаний показало отсутствие различий в прочности аллографтов после размораживания в различных температурных режимах. При размораживании аллографтов при температуре 8-10°C и при 18-20°C не было выявлено изменений со стороны гистологической структуры аллографтов в сравнении с нативными клапанами.

Заключение. Размораживание пульмональных и аортальных аллографтов в интервале температур от 8°C до 10°C в течение 1 часа является оптимальным, так как обеспечивает целостность, прочность аллографта и сохранность его гистологической структуры.

Ключевые слова: криосохраненные аллографты, предимплантационная подготовка

Objective. To optimize a defrosting regimen of cryopreserved allografts.

Material and methods. 27 cryopreserved allografts of the aortic and pulmonary valves were included in the study. Allograft sterilization was performed in antibiotic solution, containing nutritive media, cefazolin, metronidazole and fluconazole. Cryoconservation was done using program freezer at cooling rate of 1°C per minute until -80°C. Dimethylsulfoxide was used as a cryoprotectant. Three different thawing conditions were applied: 1) at 36-42°C (n=10) within 15 minutes, 2) at 18-20°C (n=7) within 35 minutes, 3) at 8-10°C (n=10) within one hour (modification of RSPC «Cardiology»). The removal of cryoprotectant was performed with gradual reduction of its concentration.

Results. The diameter and shape of allografts remained the same after completion of defrosting process in comparison with the primary patterns. Defrosted allografts had identically dense consistency at using various defrosting variants. The performed macroscopic evaluation permits to confirm that defrosting at 8-10°C doesn't lead to allograft wall ruptures.

The strength characteristics investigation during hydraulic tests revealed the absence of any differences in allografts durability after thawing in different temperature conditions. Histological evaluation of the allografts defrosted at 8-10°C and at 18-20°C didn't reveal any structure changes in comparison with native valves.

Conclusions. Defrosting of cryopreserved aortic and pulmonary allografts at the temperature from 8°C to 10°C within 60 minutes turns up to be optimal due to providing allograft integrity, endurance and its histological structure integrity.

Keywords: cryopreserved allografts, preparation of preimplantation

Novosti Khirurgii. 2013 Mar-Apr; Vol 21 (2): 76-81

Variants of cryopreserved allografts preparation before implantation

**S.V. Spiridonau, O.A. Yudina, A.P. Shket, Y.M. Chesnov, S.I. Dryk,
V.A. Adzintsov, N.N. Shchatsinka, N.N. Zuenok, Y.P. Ostrovsky**

Введение

В настоящее время криосохраненные аллографты аортального и пульмонального клапанов широко используются многими кардиохирургическими центрами мира. Использование донорских клапанов позволяет в наибольшей степени создать гемодинамические условия, максимально приближенные к характеристикам нормального нативного аортального клапана. Многолетний опыт применения аллографтов показал, что они адекватно корригируют внутрисердечную гемодинамику, существенно снижают риск тромбоэмболических осложнений, не требуют проведения пожизненной антикоагулянтной терапии, улучшают качество жизни оперированных пациентов. Однако многие вопросы остаются нерешенными и до настоящего времени. Их можно условно разделить на две группы.

1. Проблемы, связанные с выбором донора (доноры при мультиорганном заборе и при аутопсии, возраст донора, оценка пригодности будущего аллографта).

2. Проблемы, связанные с аллографтом (биологические, механические, выявляемые в процессе заготовки, хранения и подготовки к использованию).

Подготовка криоконсервированных аллографтов непосредственно перед имплантацией состоит из следующих этапов: размораживание ткани с заданной скоростью, отмывание от криопротектанта с последующим восстановлением осмотического равновесия в клетках и межклеточном веществе. Исследования криосохраненных аортальных аллографтов в большинстве случаев были направлены на изучение процессов замораживания, выбора криопротектанта, его концентрации, а так же температуры хранения. В то же время был проведен ряд исследований, показывающих, что процесс размораживания также оказывает существенное воздействие на появление макро- и микроскопических повреждений. Так, V. Farrant и W. Woolger выявили, что повреждение биологических тканей связано с формированием внутриклеточного льда во время процесса согревания, а не во время кристаллизации молекул воды при охлаждении [1].

Сегодня проблема появления дефектов в криосохраненных аллографтах при размораживании достаточно остро стоит перед всеми банками тканей и органов. По данным ряда авторов, около 5% аллографтов имеют трещины после размораживания [2, 3]. Некоторые авторы отмечали более высокую частоту появления трещин в аллографтах диаметром более

25 мм и никогда не наблюдали этого осложнения в аллографтах меньшего диаметра [4]. Одни исследователи полагают, что пульмональные аллографты более подвержены разрывам, чем аортальные [5], а другие наоборот считают аортальные клапаны более хрупкими [6].

Многие исследователи рекомендуют проводить быстрое размораживание, так как медленное размораживание приводит к повреждению клеток из-за формирования внутриклеточных кристаллов льда [2, 7, 8, 9]. Образование внутриклеточных кристаллов льда при размораживании получило название процесса рекристаллизации. Замерзшие клетки и ткани содержат кристаллы льда различных размеров и незамерзшую воду в жидком агрегатном состоянии, т. е. определенный раствор. Наличие кристаллов различной величины связано с разницей скоростей замораживания, находящихся на различной глубине от поверхности участков клетки, содержащих воду. Эта гетерогенная система кристаллов разной величины менее устойчива. При размораживании она постоянно изменяется в сторону уменьшения числа кристаллов льда и увеличения их объема. Широко используется методика медленного замораживания (со скоростью криоконсервации 1°С в минуту), с быстрым процессом размораживания, что позволяет увеличить жизнеспособность клеток.

В 1997 году D. Pegg et al. [10] показали, что повреждение криоконсервированной ткани встречается довольно часто, если начальный процесс размораживания выполняется недостаточно быстро. Они наблюдали повреждения аллографтов в результате рекристаллизации при изменении температуры от -180 до -100°С. D. Pegg доказал, что рекристаллизация обычно происходит при температуре -123°С [10]. Быстрое начальное согревание со скоростью менее, чем 50°С в минуту до температуры 100°С уменьшает эффект рекристаллизации. Поэтому производитель LifeNet Health (Virginia, USA) рекомендует после извлечения криосохраненного аллографта из паров жидкого азота выдерживать аллографт в течение 7 минут при комнатной температуре для быстрого согревания. Было показано, что такое размораживание приводит к согреванию криоконсервированного аллографта до температуры -105°С, что предотвращает потенциальную рекристаллизацию молекул воды в ткани. В последующем аллографт погружается в согревающий водный раствор с температурой 36°С [2]. При этом криоконсервированная ткань быстро согревается со скоростью 50 градусов

в минуту от изначальной температуры -100°C . Через 2 минуты криосохраненная ткань согревается до -30°C , а через 3 минуты до -14°C . В целом, размораживание на водяной бане при температуре 40°C занимает около 4-х минут.

Производитель LifeNet Health (Virginia, USA) исследовал эффективность процесса размораживания при температуре от $+60$ до $+80^{\circ}\text{C}$. Хотя процесс оттаивания был довольно быстрым, было выявлено несколько отрицательных моментов, основным из которых было появление градиента температур между наружной и внутренней поверхностями аллографта (снаружи около $+10^{\circ}\text{C}$, а внутри кондуита – отрицательная температура), что приводило к полному разрыву кондуита. Поэтому, размораживание при температуре выше 42°C в настоящее время не рекомендуется. Практически все банки тканей и органов сталкивались с повреждением аллографтов после их быстрого размораживания.

В то же время имеются исследования, в которых предпочтение отдается медленному процессу размораживания [11], а в некоторых исследованиях даже автоматически контролируемому медленному процессу размораживания [12]. Следует отметить, что размораживание при низких температурах связано с более длительным периодом времени, необходимым для подготовки аллографта перед имплантацией, что приводит к удлинению времени искусственного кровообращения.

Оптимизация процесса размораживания также позволит избежать токсического воздействия криопротектанта – диметилсульфоксида, которое проявляется при температуре более $+10^{\circ}\text{C}$ [13].

Процесс удаления криопротектанта из размороженного аллографта тоже недостаточен изучен. Следует отметить, что повреждение клеток происходит не только при согревании во время рекристаллизации воды, но и во время восстановления осмотического градиента внутри и снаружи клеток. Так Д. В. Бритиков предложил трехступенчатый процесс удаления криопротектанта с постепенным уменьшением его концентрации [14]. В то же время в других исследованиях разницы между одномоментным и многоступенчатым процессом отмывки получено не было [15].

В связи с вышесказанным нами было проведено исследование, направленное на определение оптимальных температурных режимов размораживания криосохраненных аллографтов на основе оценки их механических и гистологических свойств.

Цель исследования: оптимизировать тем-

пературный режим размораживания криосохраненных аллографтов.

Материал и методы

В исследование было включено 27 криосохраненных аллографтов аортальных и пульмональных клапанов. 14 клапанов были забраны у живых доноров во время мультиорганоного забора, 13 от трупов в первые 12 часов после смерти. Данное исследование одобрено этическим комитетом ГУ РНПЦ «Кардиология» (№ 4а от 21 февраля 2012 г.).

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 данном растворе в течение 24 часов при 4°C . Замораживание производили с использованием криопротектанта диметилсульфоксида со скоростью 1 градус Цельсия в минуту до температуры -80°C . Раствор для криоконсервации состоял из 160 мл питательной среды RPMI 1640, 20 мл диметилсульфоксида и 20 мл 10% человеческого альбумина. Криоконсервация осуществлялась на программном замораживателе в пакетах для криоконсервации фирмы Fresenius Kabi.

Размораживание проводилось по трем режимам.

1. При температуре $36-42^{\circ}\text{C}$ за 15 минут ($n=10$).
2. При температуре $18-20^{\circ}\text{C}$ за 35 минут ($n=7$).
3. При температуре $8-10^{\circ}\text{C}$ за 1 час ($n=10$), (модификация РНПЦ «Кардиология»).

Размороженные аллографты оценивали визуально, проводили гидравлические тесты 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, повреждения и разрывы стенок аллографтов ушивали однорядным швом нитью пролен 4/0. 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 створки клапанов. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, орсеином по Харту для выявления эластических волокон.

Результаты

Визуальный контроль: диаметр, конфигурация оставались прежними после процесса размораживания по сравнению с исходными образцами. Размороженные аллографты имели плотную консистенцию при различных вариантах размораживания.

Целостность аллографта.

1 режим. При температуре размораживания 37°C (n=10) в 4 случаях имелись трещины в стенке аллографтов размером от 3 мм до 30 мм. (рис. 1).

2 режим. При проведении размораживания при температуре 18-20°C (n=7) в одном случае образовалась трещина в пульмональном аллографте размером до 35 мм., расположенная в средней трети легочного ствола. Аортальные аллографты дефектов не имели.

3 Режим. Размораживания при температуре 8-10°C (n=10) не приводил к появлению трещин ни в пульмональных, ни в аортальных аллографтах.

Таким образом, на основании макроскопической оценки можно заключить, что третий режим размораживания не приводит к появлению разрывов в стенках аллографтов.

Гидравлические испытания. Все аллографты, независимо от схемы размораживания, показали хорошие прочностные характеристики, превышающие в несколько раз их физиологические пределы. Так, пульмональные алло-

графты выдерживали давление до 256 ± 63 мм рт. ст., а аортальные - до 542 ± 54 мм рт. ст. При этом первоначально появлялась недостаточность пульмонального или аортального клапанов, а стенка аллографта и шов кондуита оставались состоятельными (рис. 2).

Из этого следует, что на основании проведенных исследований различные режимы размораживания не приводят к уменьшению прочностных характеристик аллографтов.

Гистологические исследования: при размораживании аллографтов при температуре 8-10°C (n=10) и при 18-20°C (n=7) со стороны гистологической структуры аллографтов не было выявлено изменений по сравнению с нативными клапанами (не подвергавшимся криосохранению и размораживанию).

При размораживании по 1 режиму при температуре 37°C (n=10), во всех исследованных случаях выявлены морфологические изменения кондуитов. Наблюдали незначительное расширение спонгиозной зоны свободного края заслонки аортального и пульмонального клапанов без изменения соотношения и конфигурации волокон и клеток соединительной ткани (рис. 3 А). Наиболее выраженными были изменения в артериальном слое синусов Вальсальвы и в меди и аорты и легочной артерии. Их толщина была увеличена за счет разрыхления, снижения плотности упаковки коллагеновых волокон и наличия очагов их деструкции. Щели между измененными коллагеновыми волокнами были заполнены базофильным веществом, однако формирования им «гроздьевидных» структур не наблюдалось (рис. 3 Б).

Эластические волокна артериального слоя синусов Вальсальвы и меди также подверглись изменениям при размораживании при температуре 37°C. При окраске методом Харту в воло-

Рис. 1. Разрыв пульмонального аллографта после размораживания при температуре 37°C

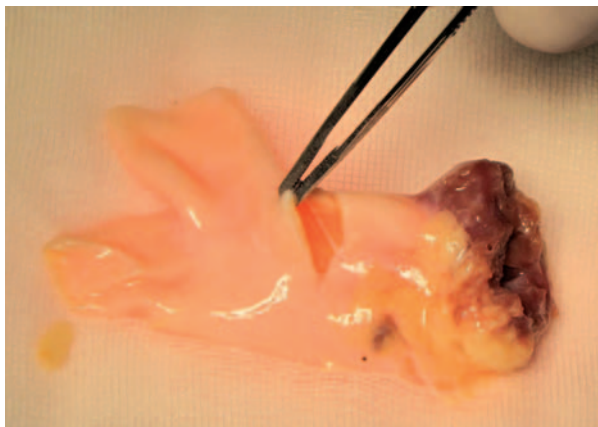
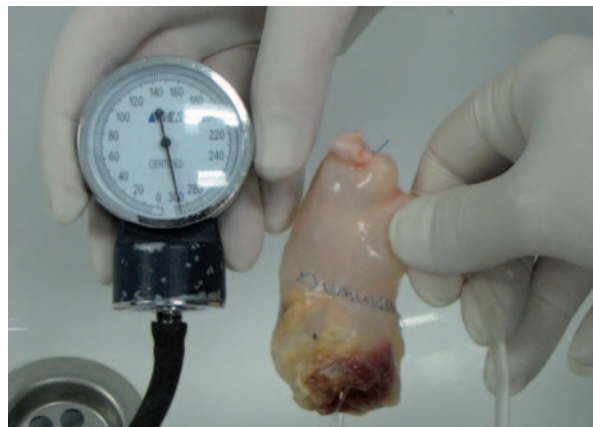


Рис. 2. Пульмональный аллографт при проведении гидравлических испытаний



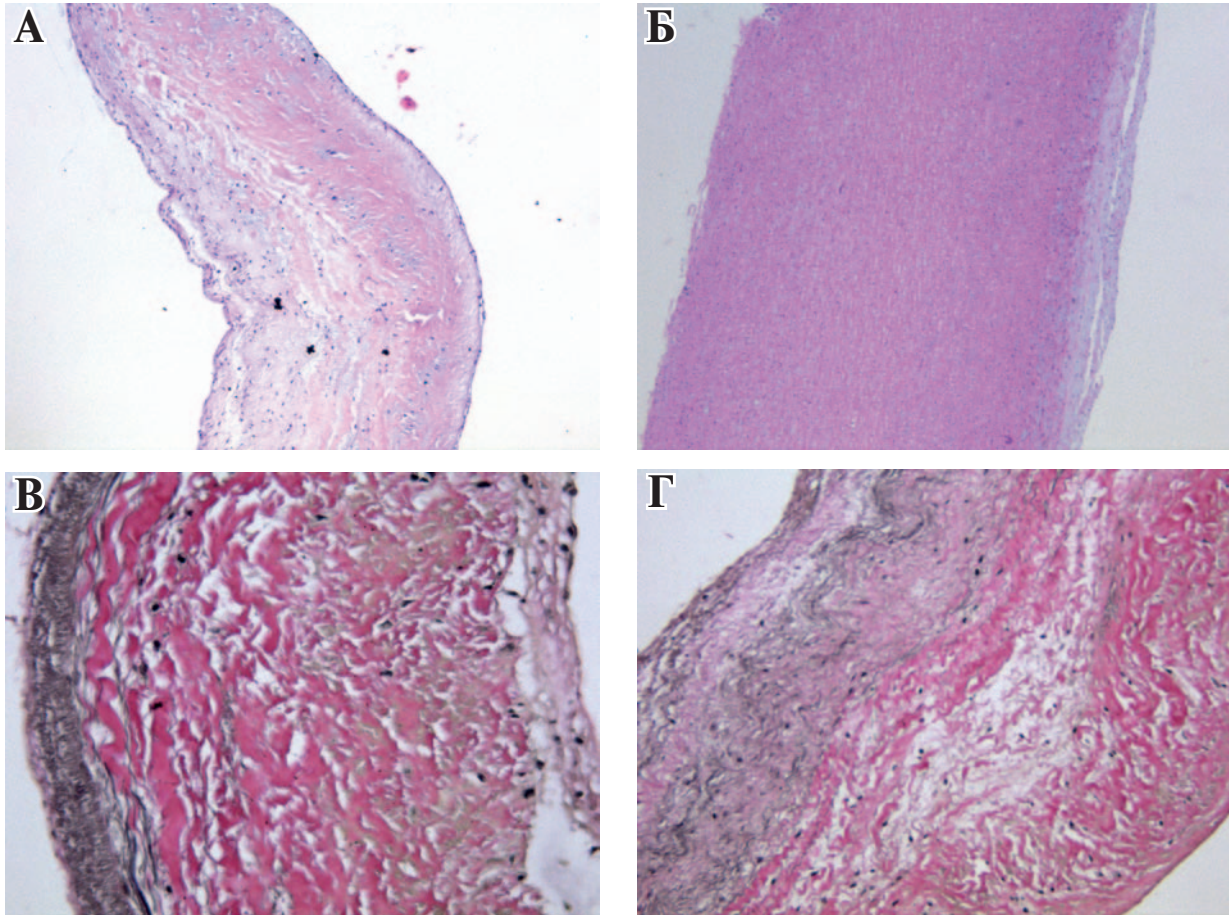


Рис. 3. Гистологическая картина аллографтов при размораживании: А – расширение спонгиозной зоны свободного края заслонки, окр. гематоксилин и эозин. Ув. $\times 50$; Б – изменения в артериальном слое синусов Вальсальвы, окр. гематоксилин и эозин. Ув. $\times 50$; В и Г – изменения эластических волокон артериального слоя синусов Вальсальвы, окр. орсеином по Харту. Ув. $\times 50$

нах выявлялись с очаги тотального эластолиза без признаков репарации (рис. 3 В и Г).

На основании полученных результатов нами была сформулирована схема предимплантационной подготовки криоконсервированных аллографтов.

1. Аллографт извлекают из криохранилища или из сосуда Дюара. Проверяют целостность пакета для криоконсервации. Оставляют пакет с аллографтом на воздухе при комнатной температуре в течение 7 минут.

2. После первых семи минут нахождения при комнатной температуре, пакет с аллографтом переносится в емкость с водой температурой $8-10^{\circ}\text{C}$, где выдерживается в течение одного часа. Для максимального сохранения жизнеспособности и структуры матрикса, манипуляции с аллографтом должны быть сведены к минимуму до его полного оттаивания. Важно не позволять аллографту согреваться более чем до 10°C во время размораживания т.к. диметилсульфоксид может быть токсичен для человеческих клеток при более высокой температуре.

3. После извлечения аллографта из пакета последний погружается в отмывающий раствор №1 на 5 минут. Раствор №1 содержит 200 мл питательной среды RPMI 1640 и 10 мл диметилсульфоксида. Аортальный аллографт извлекают из пакета за переднюю створку митрального клапана, а пульмонального аллографта за мышечную манжетку.

4. Затем аллографт переносится в отмывающий раствор №2 также на 5 минут. Отмывающий раствор №2 содержит 200 мл питательной среды RPMI 1640 и 5 мл диметилсульфоксида.

5. После отмывания аллографта от криопротектанта аллографт погружается в питательную среду RPMI 1640. Аллографт всегда должен быть влажным или находиться в питательной среде до начала процесса имплантации. Нельзя позволять тканям аллографта высохнуть в течение времени имплантации, т.к. высыхание аллографта может привести к уменьшению количества жизнеспособных клеток и стать причиной структурных повреждений матрикса.

Точное соблюдение протокола позволяет получить прогнозируемый результат в отношении прочностных характеристик аллогraftа и функции последнего в постимплантационном периоде.

Заключение

Проведение макроскопической оценки, исследование прочностных и гистологических характеристик пульмональных и аортальных аллогraftов размороженных в интервале температур от 8 до 10°C за 1 час (Режим 3) показало, что данный вид предимплантационной подготовки является оптимальным, так как обеспечивает целостность, прочность аллогraftа и сохранность его гистологической структуры.

Конфликт интересов отсутствует

ЛИТЕРАТУРА

1. Luyet B. Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of four cryoprotective agents 1 / B. Luyet, D. Rasmussen // Cryobiology. – 1968 Mar-Apr. – Vol. 4. – Is. 5 – P. 247.
2. Hopkins R. A. Cardiac reconstructions with allograft valves / R. A. Hopkins. – New York : Springer Verlag, 1989. – P. 55–58.
3. Long term follow-up of patients with antibiotic sterilized aortic homograft valve inserted freehand in the aortic position / B. G. Barratt-Boyes [et al.] // Circulation. – 1987 Apr. – Vol. 75, N 4. – P. 768–77.
4. Allograft aortic valve replacement: Long-Term Follow-up / M. F. O'Brien [et al.] // Ann Thorac Surg. – 1995 Aug. – Vol. 60. – 2 Suppl. – P. S65–70.
5. Shapira O. M. Aortic Valve Replacement With Cryopreserved Aortic Allograft: mid-term results / O. M. Shapira, R. J. Shemin // J Card Surg. – 1994. – May. – Vol. 9, N 3. – P. 292–97.
6. Cracks in cryopreserved aortic allografts and rapid thawing. C. Wassenaar [et al.] // Ann Thorac Surg. – 1995 Aug. – Vol. 60. – 2 Suppl. – P. S165–7.
7. Long-term follow-up of viable frozen aortic homografts / W. W. Angell [et al.] // J Thorac Cardiovasc Surg. – 1987 Jun. – Vol. 93, N 6. – P. 815–22.
8. Armiger L. C. Viability studies of human valves prepared for use as allografts / L. C. Armiger // Ann Thorac Surg. – 1995 Aug. – Vol. 60. – 2 Suppl. – P. S118–20.
9. Kryokonservierung humaner Spenderherzklappen in der Herzklappenbank in Rotterdam / H. Thijssen [et al.] // Z Herz Thorax Gefasschir. – 1992. – Vol. 6. – P. 49–55.
10. Pegg D. E. The history and principles of cryopreservation / D. Pegg // Semin Reprod Med. – 2002 Feb. – Vol. 20, N 1. – P. 5–13.
11. Gradual thawing improves the preservation of cryopreserved arteries // J. Bujan [et al.] // Cryobiology. – 2001 Jun. – Vol. 42, N 2. – P. 256–65.
12. Comparison of different thawing methods on cryopreserved aorta / Y. M. Oh [et al.] // Korean J Thorac Cardiovasc Surg. – 2004 Feb. – Vol. 37, N 2. – P. 113–18.
13. Birtsas V. Heart valve cryopreservation protocol for addition of dimethyl sulphoxide and amelioration of putative amphotericin B toxicity / V. Birtsas, W. J. Armitage // Cryobiology. – 2005 Apr. – Vol. 50, N 2. – P. 139–43.
14. Бритиков Д. В. Организация производства аллогraftов, опыт их клинического применения в НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева и основные направления развития / Д. В. Бритиков // Мед. науки. – 2004. – № 1. – С. 10–17.
15. Armitage W. J. Protocols for thawing and cryoprotectant dilution of heart valves / W. J. Armitage, W. Dale, E. A. Alexander // Cryobiology. – 2005 Feb. – Vol. 50, N 1. – P. 17–20.

Адрес для корреспонденции

220036, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Р. Люксембург, д. 110,
ГУ РНПЦ «Кардиология»,
2-е кардиохирургическое отделение,
тел. раб.: +375 17 208-68-05,
e-mail: spiridonov@telegraf.by,
Спиридонов Сергей Викторович

Сведения об авторах

Спиридонов С.В., к.м.н., врач-кардиохирург ГУ РНПЦ «Кардиология».
Юдина О.А., к.м.н., заведующая отделением общей патологии УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро».
Шкет А.П., к.м.н., врач-кардиохирург, заведующий 2-м кардиохирургическим отделением ГУ РНПЦ «Кардиология».
Чеснов Ю.М., д.м.н., врач-кардиохирург ГУ РНПЦ «Кардиология».
Дрык С.И., заведующая отделением сепарации и криоконсервации костного мозга УЗ «9-я городская клиническая больница».

Одинцов В.О., врач-кардиохирург ГУ РНПЦ «Кардиология».
Щетинко Н.Н., врач-кардиохирург ГУ РНПЦ «Кардиология».
Зуенок Н.Н., врач отделения сепарации и криоконсервации костного мозга УЗ «9-я городская клиническая больница».
Островский Ю.П., член-корреспондент НАН, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией хирургии сердца ГУ РНПЦ «Кардиология», заведующий кафедрой кардиохирургии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Поступила 11.01.2013 г.