

Пономарев А. И., Макеев О. Г.,  
Зверева А. И., Коротков А. В.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСЕРВИРУЮЩИХ СВОЙСТВ КЛАТРАТОВ ИНЕРТНОГО ГАЗА КСЕНОНА НА МОДЕЛИ КРАТКОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ КОЖНЫХ ЛОСКУТОВ

Лаборатория технологий клеточной и генной терапии ГБУЗ СО ИМКТ,  
Отдел молекулярных и клеточных технологий ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ

### Введение

Проблема сохранности биообъектов (клеток, тканей, органов) с целью дальнейшего использования для заместительной терапии во все времена привлекала внимание исследователей, работающих в различных областях практической медицины. При этом создание надежных методов длительной консервации донорских органов способствовало бы не только повышению жизнеспособности и результативности трансплантации, но и снижению их дефицита. Еще более остро ставится вопрос сохранности относительно «простых» структур, например роговицы, а также кожных лоскутов, применяемых в значительных объемах в комбустиологии.

Методы консервации подразделяются на гипотермический и ультранизкотемпературный. Первый предполагает хранение в зоне умеренно низких температур (0, +4 °С), во втором методе основная температура хранения — от минус 80 °С до температуры жидкого азота (-196 °С). Оба метода предусматривают использование криопротекторов, защищающих биообъекты от воздействия низких температур. Для защиты живых объектов при гипотермии используются растворы непроникающих полимеров (полиэтиленгликоль, декстран, Optisol, cpda-1), которые не представляют опасности для клеток, но и сроки хранения при использовании такого метода ограничены. Так, для эритроцитов они составляют не более 21 суток, а для роговицы — не более 7 суток. Низкотемпературное криоконсервирование (-80, -196 °С), предусматривающее увеличение сроков хранения (от 1 года и более), для предотвращения кристаллообразования льда вне- и внутри клеток предполагает использование высокомолекулярных проникающих через клеточную мембрану гипертоических растворов спиртов — диметилсульфоксида и глицерина. Однако, наряду с криопротективным действием, эти растворы в рабочей концентрации (5–10 %) оказывают многочисленные негативные эффекты на клетки. Возникают как отсроченные реакции, так и прямые токсические эффекты, связанные не только с разрушением консервируемых клеток, но и с эпигенетическими нарушениями, обуславливающими фрагментацию ДНК, укорочение теломер и способность вызывать нежелательную дифференцировку стволовых клеток. Наряду с этим, криопротекторы способны приводить к изменению экспрессии целого ряда генов, таких как *sxcr4b* — рецептор хемокинов, *rou5f1* — октамер связывающий фактор 3/4 (OCT3/4), *vasa* — кодирующий основной белок геликаз, *sox2* [1, 2, 3, 11, 12]. Все это ставит вопрос о разработке новых методов консервации живых объектов.

Одним из перспективных методов может стать хранение в клатратах. Предпосылки для разработки этого метода основаны на представлении о способности некоторых инертных газов образовывать новое состояние воды, представляющее собой рыхлую ячеистую структуру как вне, так и внутри биообъектов [4, 5]. Теория о консервирующем действии клатратов базируется на том, что вода в норме служит средой для протекания всех биохимических процессов в живых объектах, а ее иммобилизация будет блокировать метаболизм и консервировать клетки [5, 6, 7]. Важная особенность образования клатратов – одномоментность клатрирования всего консервируемого объема в отсутствие центров кристаллизации и растущего ледяного фронта, выступающих в качестве основных механизмов разрушения криоконсервированных клеток. Известны работы по применению клатратов инертных газов с целью сохранения суспензий бактерий, криоконсервации в клатратах ксенона мышинных сердец, а также мезенхимальных стволовых клеток человека [8, 9, 10]. Однако до сих пор отсутствуют сведения по консервации в клатратах инертных газов мультиклеточных структур человека. В связи с этим была сформулирована цель работы: исследовать возможность применения ксенона в качестве консервирующего агента для хранения кожных лоскутов человека в качестве ресурса для получения дермальных фибробластов.

#### Материалы и методы

В экспериментах были использованы кожные лоскуты человека, полученные с передней брюшной стенки от 7 доноров в возрасте 30–45 лет при оперативных вмешательствах на брюшной полости и предназначенные для утилизации. Кожные эксплантаты инкубировали в культуральной среде, содержащей антибиотики в стандартных культуральных концентрациях (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин, тилозин) для предотвращения возможной контаминации. Далее в стерильных условиях из центральной части образцов от каждого донора от подкожно-жировой клетчатки отделяли два равновеликих кожных лоскута размером 0,5 \* 1,0 см, на всю глубину кожи. Один из лоскутов подвергали консервации, другой без промежуточных этапов направляли на гистологическое исследование и экспансирование фибробластов. Всего было исследовано 14 кожных лоскутов по 7 образцов в каждой группе.

Для консервации кожных лоскутов в клатратах ксенона было разработано специальное устройство (рис. 1), которое позволяет в замкнутом объеме рабочей камеры (50 см<sup>3</sup>) получать гипербариию ксенона до 10 атм. и сохранять заданное давление с потерями не более 0,1 атм. в сутки. Устройство имеет универсальный порт для подачи в камеру ксенона и других газов. Дном рабочей камеры является терморегулируемая платформа, благодаря которой возможно управление и поддержание в рабочей камере температуры в диапазоне от – 5 до + 24 °С. Устройство имеет прозрачное окно для возможности наблюдения за состоянием консервируемых образцов. Рабочая камера позволяет разместить в ней до 7 штук 2 мл криопробирок (Nalgene). Для экспериментов использовали ксенон высокой степени чистоты (99,999 %).

Для исследования экспансии фибробластов кожные лоскуты культивировали согласно принятым протоколам [13] в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки FBS (Sigma). Контроль и подсчет экспансированных фибробластов проводили одновременно с заменой среды не реже



Рисунок 1. Прибор для консервации кожных лоскутов в клатратах ксенона

одного раза в трое суток с помощью оптического микроскопа (Olympus) при 200-кратном увеличении. Результаты выражали в количестве экспансированных фибробластов на 1 мм среза исследуемого кожного лоскута (Табл. 1). По достижении монослоя фибробластов на культуральной поверхности полученные клетки снимали раствором трипсина и пересевали на матрасы большей площади. Гистологическое исследование кожных лоскутов проводили согласно стандартным методикам [14] с использованием окраски гематоксилин-эозин. Описывали состояние дермального и эпидермального слоев кожи исследуемых образцов.

Исследуемые лоскуты консервировали в клатратах ксенона при избыточном давлении 3 атм. и температуре внутри камеры не выше + 2 0С. Контроль клатратообразования проводили визуально через прозрачное окно. При этом клатрированная кожа приобретала твердую консистенцию, не поддавалась деформации и напоминала ткань, покрытую снегом. Лоскуты консервировали в заданных параметрах 4 суток, далее проводили расконсервацию образцов и повторяли протокол исследования интактных образцов кожи. Экспансию фибробластов исследовали согласно «Способа получения культуры клеток кожи» [15].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы MS Excel 2008 для PC. Анализ проводили с применением параметрических критериев. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты и обсуждение**

В процессе культивирования кожных лоскутов были получены данные о количестве экспансированных фибробластов как в опытной, так и в контрольной группах (Табл. 1).

Из полученных результатов следует, что динамика экспансии фибробластов в опытной группе ниже, чем в интактной. Однако уже к 15 суткам культивирования консервированных в клатратах ксенона кожных лоскутов различия опыт/контроль в динамике роста и экспансии фибробластов нивелируются. Полученные результаты можно объяснить тем, что дермальный слой кожи в опыте сохранил целостность и архитектуру, затрудняющую краевую экспансию фибробластов, а часть фибробластов кожи сохраняет локомоторную активность после консервации в клатратах ксенона. Также имеет место известное свойство, характерное для дифференцированных фибробластов — относи-

Таблица 1

Экспансия фибробластов из кожных лоскутов, консервированных в клатратах ксенона

Группы образцов (культивирование*)	6 суток	9 суток	12 суток	15 суток
Интактная кожа (без консервации)	$6,0 \pm 4,0$ $p = 0,036$	$31,41 \pm 10,0$ $p = 0,021$	$101,42 \pm 20,0$ $p = 0,017$	$> 200,0$
Консервация в клатратах ксенона	$15,14 \pm 5,0$ $p = 0,028$	$73,58 \pm 15,0$ $p = 0,019$	$> 200,0$	–

\* Количество культивированных клеток (в абсолютных значениях) на 1 мм среза исследуемого лоскута.

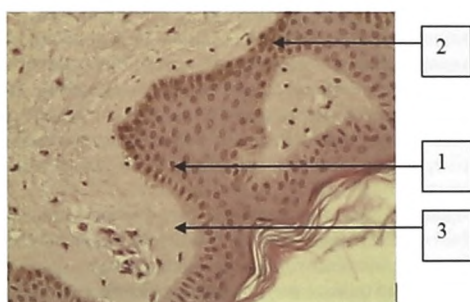


Рисунок 2. Гистологическое исследование консервированных в клатратах ксенона кожных лоскутов. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. 200. Отмечается некоторая вакуолизация цитоплазмы кератиноцитов (1), при сохранении целостности меланоцитов (2) и дермального слоя (3).

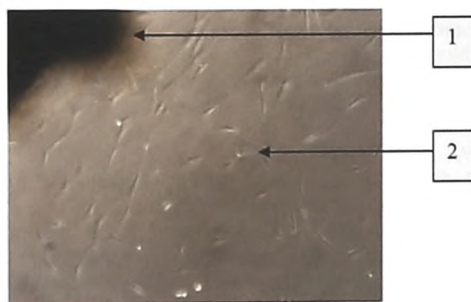


Рисунок 3. Оптическая микроскопия культивированного лоскута кожи (1), консервированного в клатратах. Ув.: 400. 15 сутки культивирования тенденция к формированию монослоя фибробластов (2).

тельная стойкость к термобарическим перепадам. Это может объяснить меньшие темпы динамики деления в пределах 3-х суток в отличие от интактной группы. Тем самым важен сам факт экспансии некоторого количества «клеток-пионеров», который служит основанием для вывода о консервирующем эффекте ксенона и его клатратов.

Гистологическая картина подтвердила данные предположения. Исследованные срезы консервированных лоскутов морфологически не отличались от интактных за исключением некоторой вакуолизации цитоплазмы кератиноцитов (рис. 2). Это, по всей видимости, может быть связано с режимом декомпрессии, который был использован во время расконсервации образцов. Кроме того дермальный слой кожи не претерпел каких-либо значимых изменений, что еще раз подтверждает представление о большей устойчивости этого слоя к декомпрессионным воздействиям.

Эксперименты завершали по достижению устойчивого монослоя фибробластов на культуральной поверхности с фиксированными кожными лоскутами.

Экспансированная культура клеток демонстрировала устойчивую динамику роста. Клетки в опытной группе визуально не отличались от интактных и нормально перенесли пересев на матрасы большей площади. При этом необходимо отметить, что во всех группах сравнения и исследуемых образцах уже к 15 суткам культивирования отмечалась тенденция к формированию монослоя фибробластов (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о наличии консервирующего эффекта у клатратов ксенона в условиях хранения кожных лоскутов. Однако, наличие вакуолизированных кератиноцитов дает основание для планирования дальнейшего исследования по оценке иммуногистохимических характеристик клеток кожных лоскутов, в частности, маркеров целостности как стволовых (к14), так и дифференцированных клеток эпителия (к4, к13, к1, к10), что позволит оценить сохранность эпидермального слоя кожи.

### Выводы

1. Ксенон и его клатраты не оказывают прямого токсического эффекта на кожные лоскуты и фибробласты.

2. Клатраты ксенона обладают консервирующим действием в отношении клеток кожных лоскутов и применимы для краткосрочной консервации фибробластов в составе целой ткани.

3. Отмечен некоторый эффект вакуолизации цитоплазмы кератиноцитов при консервации в клатратах, требующий дополнительных исследований.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Davis J. M., Rowley S. D., Braine H. G. et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. // Blood 1990; 75: 781-6.

2. Alonso J. M. 3rd, Regan D. M., Johnson C. E., et al. Simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences // Cytotherapy.-2001.-Vol.3(6).-P.429-433.

3. Seung-H., Chunyan Y., Qi M., Michal M., Mariusz A. Wasik Pin Lu and Y. Lynn W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Promotes Lymphocyte Survival through Its Actions on Cellular Metabolic Activities // The Journal of Immunology, 2006, 177: 3737-3745.

4. Тельпухов В. И., Щербаков П. В. Клатратная криоконсервация. // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2012.-Т. 15.-№3 (42). – С. 77-80.
5. Rodin, V. V., Isangalin F. S., et al. Structure of protein solutions in a presence of xenon clathrate // *Cryobiology & Cryo-Medicine* 1984, 14: p. 3-7.
6. Голдовский А. М. Анабиоз и его практическое значение – Л.: // Наука, 1986. – 169 с.
7. Манаков А. Ю. Клатратные гидраты при высоких давлениях – структура, состав, свойства // Автореф. дисс. на соискание учен. степ. докт. хим. наук. – Новосибирск, 2007. – 32 с.
8. Sheleg, S., Nixon H., et al. Cardiac Mitochondria I Membrane Stability after Deep Hypothermia using a Xenon Clathrate Cryostasis Protocol - an Electron Microscopy Study // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2008, 1(5): p. 440-447.
9. Макеев О. Г., Пономарев А. И., Коротков А. В. Применение клатратобразующего газа для криоконсервации мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2010. - №1. – С. 59-62.
10. Способ криоконсервации мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток кожи. Патент РФ № 2433173.
11. Robert C., Manu V., Daniel A., Matthew G. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing // *Nature communications* 2014 5 (3244), doi:10.1038/ncomms 4244.
12. Changjun Z., Wenpei P., Li D., Lian H., Yan Z., Donghui F., Keyi T. A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation // *Cryobiology* Volume 69, Issue 1, August 2014, P. 119–127.
13. Pollard J. W. Basic cell culture. // *Methods Mol. Biol.* 1990;5: p 1-12.
14. Tanaka Y., Matsuo K., Yuzuriha S. Long-term histological comparison between near-infrared irradiated skin and scar tissues. // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2010 Nov 25;3:143-9.
15. Способ получения культуры клеток кожи. Патент РФ № 2345781.