

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «УРАЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Пономарев Александр Игоревич

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ХОЛОДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
НА КЛЕТКИ И ТКАНИ ПРИ КОНСЕРВАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РАЗЛИЧНЫХ ТЕРМОБАРИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ КСЕНОНА**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Макеев Олег Германович

Екатеринбург – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Значение сохранения биообъектов для медицины.....	11
1.2 Механизмы холодового повреждения биообъектов	13
1.3 Криопротекторы и ограждающие растворы для консервации.....	16
1.4 Побочные эффекты консервирующих растворов.....	19
1.5 Новые способы консервации биообъектов	23
1.6 Консервация с использованием инертных газов	26
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1 Общая характеристика экспериментального материала	32
2.1.1 Характеристика эритроцитов.....	32
2.1.2 Общая характеристика лабораторных животных	33
2.1.3 Общая характеристика тканей, использованных для оценки морфофункциональных характеристик.....	34
2.1.4 Криоконсервация кожных лоскутов в ДМСО (диметилсульфоксид) и отогрев	35
2.1.5 Характеристика клеток, использованных в исследовании. Получение первичной культуры. Субкультивирование.	36
2.2 Гипербарическая и клатратная консервация в Хе	40
2.2.1 Описание устройства для консервации в гипербарии и клатратах Хе	41
2.2.2 Принцип действия устройства.....	44
2.2.3 Получение и визуализация клатратов ксенона в биообъектах. Декомпрессия (расконсервация) образцов	44
2.2.4 Используемые в экспериментах газы.....	45
2.3 Методы исследования жизнеспособности клеток и тканей	46
2.3.1 Расчет показателей гемолиза	46
2.3.2 Кондуктометрический метод оценки сохранности клеток	46
2.3.3 Исследование жизнеспособности клеток с помощью МТТ теста.....	47
2.3.4 Исследование способности тканей к экспансии фибробластов	48
2.3.5 Исследование жизнеспособности клеток с помощью окраски флуоресцентным красителем Life-Dead viability Kit	48
2.4 Исследование сохранности морфологических характеристик клеток и тканей	50
2.4.1 Методы окраски и морфометрия окрашенных препаратов клеток.....	50

2.4.2 Методы окраски и морфометрия окрашенных препаратов тканей.....	50
2.4.3 Исследование мембран клеток с помощью метода сканирующей электронной микроскопии.....	51
2.5 Методы исследования функциональной сохранности клеток и тканей.....	52
2.5.1 Исследование осмотической резистентности Эр.....	52
2.5.2 Изучение динамики приживаемости кожных лоскутов лабораторных животных на модели аутотрансплантации	53
2.5.3 Исследование скорости оседания Эр	56
2.5.4 Исследование клоногенной активности культивируемых клеток	56
2.5.5 Исследование синтетической активности клеток по включению в ДНК 2^{14}C –тимидина	57
2.6 Статистическая обработка данных	57
3. КОНСЕРВАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ КСЕНОНА И ЕГО КЛАТРАТОВ	60
3.1 Исследование морфофункциональных характеристик Эр	60
3.2 Исследование сохранности мембран эритроцитов и определение их осмотической резистентности.....	64
3.3 Электронная микроскопия эритроцитов и оценка повреждений на разных сроках	74
3.4 Заключение.....	78
4. КОНСЕРВАЦИЯ КОЖНЫХ ЛОСКУТОВ В ГИПЕРБАРИИ И КЛАТРАТАХ КСЕНОНА	81
4.1 Исследование сохранности кожных лоскутов in vivo.....	82
4.2 Оценка приживаемости кожных лоскутов при различных способах консервации на 14-е и 28-е сутки после трансплантации	87
4.3 Исследование сохранности кожных лоскутов in vitro	92
4.4 Заключение.....	98
5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КОНСЕРВИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА КСЕНОНА НА ЯДРОСОДЕРЖАЩИЕ КЛЕТКИ.....	102
5.1 Исследование жизнеспособности и морфофункциональных характеристик ММСК, консервированных в различных вариантах использования ксенона.....	103
5.2 Заключение.....	111
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
Список литературы	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AFP	anti freeze proteins
CAS	cell alive system
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline
Hb	гемоглобин
PBS	phosphate buffered saline
PEST	penicillin, streptomycin
Xe	ксенон
АДП	аутодермопластика
АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
АцКоА	ацетилкоэнзим А
БРС	быстроразъемное соединение
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ММСК	мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки
НАД	никотинамиддинуклеотид фосфат (окисленный)
НАДН	никотинамиддинуклеотид фосфат (восстановленный)
ПЖК	подкожно-жировая клетчатка
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПЭА	полиэтиленалкоголь
ПЭВМ	портативные электронно-вычислительные машины
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ПЭО	полиэтиленоксид
РМ	регенеративная медицина
РНК	рибонуклеиновая кислота
СК	стволовые клетки
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ФБС	фетальная бычья сыворотка
ФК	фибробластоподобные клетки
ЦТК	цикл трикарбоновых кислот

ЦФДА	раствор цитрата натрия, фосфатного буфера, декстрана и аденина
ЭВМ	электронно-вычислительные машины
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
Эр	эритроциты
ЭСК	эмбриональные стволовые клетки
ЭТЦ	электрон-транспортная цепь
ЯМР	ядерно – магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Проблема изучения механизмов холодового воздействия многие годы является предметом патофизиологических исследований. Однако в последние десятилетия эта проблема приобрела особый контекст, обусловленный ускоренным развитием регенеративной медицины и смежной с ней области биобанкирования [7, 17]. Объектом исследований регенеративной медицины является изучение регенераторного потенциала организма, стимуляция регенерации через запуск эндогенных механизмов регенерации, а также поиск путей активации регенерации с использованием трансплантации клеток, тканей или органов [25, 58, 152]. Последнее обстоятельство предполагает применение технологий консервации биологического материала с целью накопления достаточного количества и обеспечения надлежащего качества трансплантатов.

Считается, что надежная и стабильная консервация осуществляется при криогенных температурах (-78°C и ниже). Однако, при этом развиваются множественные патогенные явления, связанные с действием холода при преодолении консервируемым биообъектом критических точек замораживания. Известно, что самыми сложными из них являются кристаллизация, холодовой и гипертонический шок. С целью предотвращения запуска данных механизмов используются давно известные растворы криопротекторов [37, 103, 171]. Однако последние не в полной мере способны защитить разнообразные биообъекты от вышеперечисленных патогенных проявлений, а эффективность их действия зависит от концентрации, высокое значение которой губительно для клеток [69, 85, 104, 114].

Альтернативой данному способу является консервация клеток и тканей в условиях глубокой гипотермии ($+4^{\circ}\text{C}$), которая позволяет сохранять нативную структуру биообъекта и его качественные характеристики, но при существенном сокращении сроков консервации.

Данные обстоятельства обуславливают существование постоянного запроса на разработку и внедрение новых способов гипотермической консервации, которые были бы лишены или могли свести к минимуму недостатки предыдущих техник. За счет того, что при таких температурах ($+4^{\circ}\text{C}$ и выше) не происходит значительных конформационных перестроек макромолекул и структуры воды [80].

Одним из перспективных способов гипотермической консервации может стать хранение биообъектов в газовых гидратах – клатратах при $+4^{\circ}\text{C}$. Действие последних основано на иммобилизации вне- и внутриклеточной воды консервируемого объекта с остановкой большинства метаболических реакций. При этом с помощью некоторых тяжелых газов, например, ксенона, становится возможным получение клатратов при околонулевых, но положительных температурах и умеренном давлении [8, 19, 47], что исключает потенциальную

возможность образования в биообъекте кристаллов, а также холодового и гипертонического шока.

Существующий научный задел в данном направлении представлен крайне ограниченными данными, касающимися разнообразных исследований принципиальных возможностей использования клатратов газов для консервации различных биообъектов – клеток и тканей млекопитающих [21, 22, 50, 52, 126, 148]. Вместе с тем, отсутствуют данные, связанные с применением различных режимов консервации в клатратах или гипербарии клатратобразующих газов, а также их экспериментальное обоснование. При этом известно, что клатраты представляют собой качественно новое состояние вещества, больше напоминающее прессованный снег, в то время как обычное гипербарическое воздействие газа не изменяет его структуры. Кроме того, отсутствуют сведения о структуре клатратного льда в консервируемых биообъектах при различных условиях хранения. Равно как нет внятных протоколов и убедительных результатов, касающихся исследования функциональной активности биообъектов, консервированных в клатратах или гипербарии, а также их сравнения с конвенциональными способами консервации.

Таким образом, изучение механизмов протективного действия клатратов и гипербарии при различных термобарических условиях с целью защиты от возникающих повреждений при гипотермической консервации и разработка на основе этих данных новой технологии консервации является актуальной медико-биологической задачей и может найти применение в биобанкировании.

Цель исследования – Изучение возможности применения клатратов и гипербарии ксенона для повышения эффективности консервации клеток и тканей в условиях глубокой гипотермии.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние различных термобарических условий ксенона: клатраты (6 атм.) и гипербария (3 атм.) с целью консервации эритроцитов в условиях глубокой гипотермии (+4 °C) путем оценки их морфофункциональных характеристик.
2. Исследовать возможность использования сочетанного воздействия глубокой гипотермии (+4 °C) и ксеноновой гипербарии различной степени интенсивности на сохранность структурных и функциональных показателей консервированных кожных лоскутов.
3. Исследовать морфофункциональные параметры фибробластоподобных клеток, находящихся в адгезированном и суспензированном состоянии, после консервации с

использованием различных термобарических условий ксенона в сравнении с традиционным способом консервации в 10 % ДМСО при температуре – 84 °С.

4. Обосновать механизмы консервирующего действия ксенона при различных термобарических условиях: клатраты (+4 °С, 6 атм.), гипербария (+4 °С, 3 атм.) и предложить оптимальные параметры консервации различных биообъектов.

Научная новизна. Впервые установлены термобарические условия, необходимые для консервации различных биообъектов в клатратах или гипербарии ксенона в условиях глубокой гипотермии. Опытным путем показано, что момент клатрирования воды в суспензиях клеток или тканей начинается с показателей давления от 6 атм. при постоянной температуре +4 °С. При этом установлено, что применение других термобарических условий ниже этой точки, не стимулирует образование клатратов в консервируемом биообъекте, по крайней мере, макроскопически. Впервые показана структура ксенон-клатратного льда и выявлена разница между состоянием мембран клеток и околоклеточной жидкости в клатратах – твердое состояние и гипербарии ксенона – газообразное состояние. Показано, что клатратный лед близок к структуре, напоминающей аэрогель, в то время как гипербария ксенона не оказывает достоверного влияния на структуру льда.

В работе впервые сравнивается воздействие различных термобарических режимов консервации в ксеноне. Показано, что для консервации эритроцитов целесообразно использовать гипербария ксенона при глубокой гипотермии, а не клатраты ксенона. Напротив, консервация в клатратах ксенона более применима для хранения кожных лоскутов и фибробластоподобных клеток. Впервые проведена трансплантация кожных лоскутов, консервированных различными способами, и выявлено, что лоскуты, консервированные в клатратах, приживаются значительно лучше по сравнению с другими методами консервации. Впервые исследовано воздействие различных термобарических условий ксенона – клатратов и гипербарии при глубокой гипотермии (+4 °С) с целью консервации фибробластоподобных клеток, находящихся в адгезированном состоянии по сравнению с суспензированными клетками. Обоснована целесообразность применения клатратов ксенона для их консервации. Показано, что такие клетки обладают большей резистентностью к образованию и разложению клатратов, если находятся в адгезированном состоянии.

На основании проведенных исследований получены патенты:

1. Патент на изобретение RU № 2433173 Способ криоконсервации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / Макеев О.Г., Пономарев А.И., Коротков А.В.

2. Патент на полезную модель RU № 149845 Контейнер для консервации, хранения и транспортировки биоматериала / Пономарев А.И.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана и обоснована концепция применения различных термобарических условий ксенона: клатраты и гипербария с целью консервации разных биообъектов в условиях глубокой гипотермии. Предложена обобщенная гипотеза механизмов действия различных условий консервации в ксеноне на эритроциты и фибробластоподобные клетки и предложено их патогенетическое обоснование. Гипербария и клатраты ксенона реализуют свое консервирующее действие на разные типы биообъектов через разные механизмы. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование различных термобарических условий ксенона с целью консервации биообъектов может быть перспективным направлением для регенеративной медицины в области биобанкинга.

В проведенном исследовании впервые получены данные о применимости клатратов или гипербарии ксенона с целью консервации тканей, клеток и эритроцитов человека, а также приведено их сравнение с известными способами. Показано, что использование данных условий с целью консервации исследованных биообъектов значительно повышает эффективность хранения, проявляющейся лучшей сохранностью морфофункциональных характеристик. Это позволило разработать устройство и способ использования различных термобарических условий данного газа с целью консервации эритроцитов, фибробластоподобных клеток и кожных лоскутов. Разработанная и запатентованная конструкция (патент № 149845) внедрена в опытно- производственный процесс ООО «ИнПрес», в рамках государственного контракта фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере №12517р/23946. Разработанная и запатентованная технология (патент № 2433173) внедрена в учебный процесс на кафедре биологии и медицинской генетики ГБОУ ВПО УГМУ в преподавании раздела «основы криобиологии и консервация клеток» курса элективных занятий для студентов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 65-й научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2010 г.), 66-й научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2011 г.), на I Международной научно-практической конференции «Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы

современной медицинской науки, генетики и биотехнологий» (г. Екатеринбург, 2011 г.), на международной школе-конференции «Application of Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Soft Matter and Nanofabrication» (Дания, г. Альборг 2013 г.), на международной конференции по тканевой инженерии и регенеративной медицине «TERMIS EU 2014» (Италия, г. Генуя 2014 г.), на международной конференции по тканевой инженерии и регенеративной медицине «TERMIS World Congress 2015» (США, г. Бостон 2015 г.).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 11 работ. Из них в журналах, рекомендованных ВАК 5 публикаций, в том числе 3 публикации в зарубежных журналах.

Продукты интеллектуальной собственности: По теме диссертации получены 2 патента.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Сочетанное применение гипербарии ксенона и стандартного гемоконсервирующего раствора с целью консервации эритроцитарных концентратов приводит к существенному синергетическому действию двух компонентов, которое выражается в улучшении всех контролируемых параметров клеток, как в сравнении со стандартным гемоконсервантом, так и в сравнении с клатратами ксенона.

2. Использование клатратов ксенона наиболее применимо с целью консервации фибробластоподобных клеток и тканей в сравнении как с гипербарией ксенона, так и другими способами хранения. Это выражается наибольшей сохранностью совокупности морфофункциональных параметров клеток и тканей, а также вдвое лучшей приживаемостью кожных трансплантатов, консервированных в клатратах ксенона.

3. Механизмы действия клатратов и гипербарии ксенона различны и зависят от консервируемых биообъектов. В эритроцитах консервирующее действие ксенона реализуется за счет аноксии и, как следствие, исключения механизмов свободнорадикального окисления. Для фибробластоподобных клеток и тканей на первый план выходят механизмы иммобилизации вне- и внутриклеточной свободной воды и инициации анабиоза. Реализация данных механизмов возможна при использовании клатратов ксенона.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах и состоит из введения, 5 глав, общего заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами, 43 рисунками. Список литературы включает 178 источников, из которых 58 отечественных и 120 зарубежных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Значение сохранения биообъектов для медицины

Современная медицина в настоящее время все больше ориентируется на разработку новых методов лечения. Имеется несколько направлений развития медицинской науки и совершенствования традиционных методов лечения, среди которых особое место занимают персонифицированная медицина и технологии регенеративной медицины. Регенеративная медицина (РМ) предполагает восстановление утраченных функций органа или ткани как за счет традиционной трансплантации, через стимуляцию эндогенных механизмов регенерации, так и использованием клеточной терапии.

Основное место в клеточной терапии принадлежит развитию технологий восстановления организма зрелыми клетками или их предшественниками с признаками стволовости, а также разработке на их основе тканеинженерных конструкций. Уже сейчас широкое применение получили аутологичные стволовые клетки, в том числе мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) [109]. Перспективность терапии стволовыми клетками обусловлена свойствами данного типа клеток, обладающих высоким регенераторным потенциалом и способностью к дифференцировке в остео-, мио-, кардио-, хондро- и нейрогенном направлениях [1, 119]. Это, в свою очередь, создает предпосылки для их применения в терапии широкого круга заболеваний, не поддающихся в настоящее время иным методам лечения. Так, с использованием стволовых клеток уже сегодня прогнозируется успех в лечении инфарктов, инсультов, повреждении сосудов, хрящевой ткани и мышц, язв кожи, ожогов, повреждений роговицы, сложных переломов и дефектов костей [60, 150]. Предполагается, что в дальнейшем перечень заболеваний может быть значительно расширен [62].

В последнее время, особенно актуальным стоит вопрос о разработке различного рода «биочернил», основанных на технологии заключения стволовых клеток в сфероиды – шарообразные конгломераты клеток, покрытые биodeградируемой капсулой, которые служат основным субстратом для работы различного типа 3D биопринтеров [72, 128, 129, 178]. На рисунке 1 представлена общая схема организации и направлений развития РМ, а также показана роль консервации в обеспечении принципа непрерывности процессов.



Рисунок 1 - Пути развития РМ и роль консервации

Очевидно, что основным инструментом РМ является тот или иной вид биоматериала (биообъекта), используя который, врач приобретает способность лечить различные поражения органов и систем.

Однако существенным техническим препятствием широкого клинического применения различных биоматериалов является невозможность быстрого получения последних в достаточном, для практических целей, количестве [85, 110, 151]. Для решения данной проблемы используются разнообразные методы накопления и консервации биообъектов. Условно их можно разделить на две большие группы: методы, обеспечивающие краткосрочное хранение и методы долгосрочного хранения биообъектов. В краткосрочном хранении нашли широкое применение способы, основанные на субкультивировании, хранении под слоем масла или в водно-солевых растворах [66, 120, 164].

Методы гипотермической консервации и лиофильной сушки нашли применение с целью долгосрочного хранения биообъектов. При этом последняя используется для сохранения первоначальной структуры биообъекта и не предполагает сохранение его жизнеспособности. Технически способ основан на выпаривании свободной воды из замороженного образца методом вакуумной экстракции, поэтому после размораживания сохраняется лишь его первичная структура, но очевидно, теряется жизнеспособность. Таким образом, данный способ больше подходит для гистологических целей и патоморфологии, чем для нужд РМ.

Основная цель консервирования в РМ – это сохранение жизнеспособности и функциональной активности биообъектов при длительном хранении. При этом, чем дольше и лучше сохраняются эти качества, тем востребованнее будет тот или иной способ консервации [70, 157]. Поэтому временные методы хранения, такие как субкультивирование, хранение в растворах хотя и являются менее губительными для биообъектов, однако не могут найти широкого применения из-за чрезвычайной ограниченности по срокам консервации-хранения.

Единственным надежным и валидированным методом консервации биообъектов для целей как традиционной, так и РМ в настоящее время признана гипотермическая консервация [70]. Данное обстоятельство обусловлено двумя универсальными законами, которые применимы для описания метаболических реакций всех живых систем – эмпирическое правило Вант-Гоффа и уравнение Аррениуса. Первое гласит, что при каждом понижении температуры реакции на 10 °С, ее скорость падает в 2-4 раза, а согласно уравнения Аррениуса, скорость протекания реакции прямо пропорциональна энергии активации молекул веществ, которая значительно уменьшается с понижением температуры [57].

Согласно этим законам, нетрудно предположить, что чем ниже будет температура хранения консервируемого биообъекта, тем он будет лучше сохранен. Так, эмпирически доказано, что 6 минут при 37 °С по скорости метаболических реакций эквивалентны 4,5 годам при -80 °С. Таким образом, радикально снизив температуру, появляется возможность свести уровень метаболизма практически к нулю, тем самым перевести биообъект в анабиоз. Поэтому холодовое воздействие с целью консервации биообъектов является золотым стандартом, используемым в криобиологии в настоящее время. Однако на пути к надежной гипотермической консервации, биообъекту предстоит пережить негативное влияние холода, механизмы которого достаточно разнообразны.

1.2 Механизмы холодового повреждения биообъектов

Использование холода является экстремальным фактором для живых систем, которое провоцирует множество негативных эффектов со стороны всех уровней организации живой материи. Так, чем больше биообъект, тем опаснее для него будет физический фактор воздействия холода так как лед имеет меньшую плотность в сравнении с водой, однако давление его паров выше, и он имеет свойство увеличиваться в размерах на 15-20 % в сравнении с жидкостью. Таким образом, он неминуемо раскалывает крупные объекты из-за малого отношения поверхности биообъекта к его объему и большой разности температур на поверхности и в глубине объекта [37]. Наряду с этим, плотное взаимодействие клеток друг с другом также препятствует выходу свободной воды, что еще больше усугубляет воздействие

«ледяного фронта». Поэтому органы или даже относительно небольшие организмы, которые, как известно, на 80 и более процентов состоят из воды, не могут быть успешно заморожены.

Напротив, клетки или небольшие по объему ткани, практически не подвержены вышеперечисленным факторам. Ведущими в патогенезе холодового повреждения данных биообъектов выступают другие механизмы. Так, в работах [3, 4, 9, 22, 37] показано, что криоповреждения могут начинаться с холодового повреждения, возникающего вследствие уменьшения и дегидратации клеток, даже во время охлаждения до околонулевых температур (рисунок 2). Во время такого уменьшения – «сморщивания» происходит перераспределение мембранных компонентов (фосфолипидов, белков) с образованием микропор, в результате в дальнейшем может происходить консолидация пор и выход структурных белков и цитоплазматического содержимого определяющих качества клеток, и их морфофункциональную активность [3, 37, 70, 103, 117, 170, 172]. Примером может быть потеря эритроцитами (Эр) гемоглобина (Hb) в результате холодового шока.



Рисунок 2 - Холодовой шок клеток во время криоконсервации

Следующим этапом, который испытывают клетки во время низкотемпературной консервации, является воздействие температур ниже нуля градусов по Цельсию, которые инициируют механизмы кристаллизации клеток (рисунок 3). При этом данный механизм имеет значение с одной стороны, как механический фактор, повреждающий внутри- и внеклеточные мембраны клеток. С другой стороны, внеклеточное кристаллообразование выступает триггером следующего повреждающего механизма - гипертонического лизиса клеток, который приобретает особую интенсивность во время медленного охлаждения консервируемых объектов (рисунок 4).

Напротив, при быстром охлаждении, данный механизм, возможно нивелировать путем исключения формирования внеклеточных кристаллов, однако в этом случае будет наблюдаться образование внутриклеточных кристаллов [68, 115] (рисунок 3В). Последнее происходит по

причине того, что свободная вода не успеет выйти из клеток и, таким образом, будет заморожена внутри. Безусловно, размер вымороженного льда в этом случае будет больше, чем первоначальной воды внутри клеток, по крайней мере, на 10 -15 %. Следовательно, он будет представлять опасность для всех компартментов клетки не только как механический, но и как гипертонический фактор [3, 70, 103]. Поэтому в современных методах замораживания отдается предпочтение способам, базирующимся на медленном охлаждении.

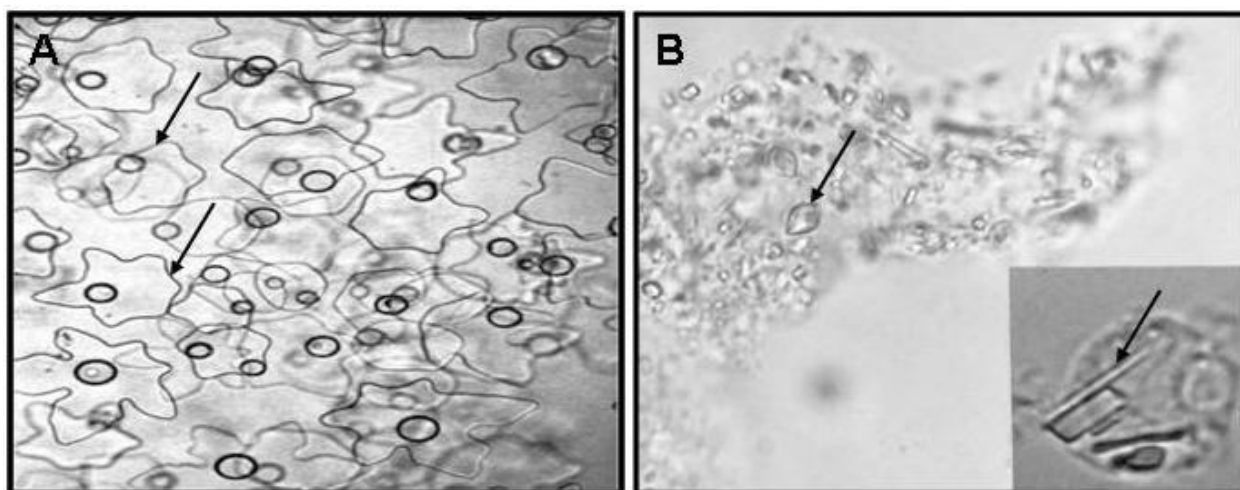


Рисунок 3 - Кристаллизация клеток во время криоконсервации (Fauci A.S., Casper D.L. 2008) А – внеклеточная кристаллизация. В – Внутриклеточная кристаллизация. Стрелками показаны кристаллы льда.

Механизм гипертонического лизиса основан на представлении о том, что при охлаждении, в первую очередь в лед превращается свободная вода. Таким образом, происходит гиперконцентрация электролитов, которые были растворены в данной воде, кристаллы льда сосуществуют с концентрированным раствором электролитов, который содержит избыточные количества ионов Na^+ и K^+ . На данном этапе происходит механическое вытеснение клеток в гиперконцентрированные каналы, так как объем первоначально образующегося льда еще недостаточно велик, чтобы повредить клетки механически. Клетки оказываются в условиях гиперосмолярности среды, поэтому далее происходит выход большей части несвязанной внутриклеточной воды по градиенту концентрации во внеклеточное пространство. Клетка уменьшается до минимальных размеров. В дальнейшем происходят формирование пор и латеральная перестройка компонентов мембран, вследствие которых может происходить потеря мембранного потенциала [3, 37, 170, 172].

Данные явления провоцируют проникновение в клетки избыточного количества ионов электролитов, которые приводят к гиперосмолярности внутриклеточного содержимого. В таких условиях нормальное существование клеток будет проблематичным, во-первых, по причине

высаливания белков и ферментов с последующей потерей реакционной способности. Во-вторых, при возвращении клетки в изотоническую среду или во время размораживания произойдет неминуемое набухание и дальнейший лизис клеток, обусловленный обратным проникновением свободной воды по градиенту концентрации. Если мембрана клеток будет достаточно эластичной, а количество поступивших электролитов низким, то лизиса клеток может и не произойти, однако вода, в любом случае, увеличит размер клеток и приведет к ее набуханию. Это может быть губительным для мембраносвязанного материала, например, структурных белков, определяющих функцию клеток (рисунок 4) [3, 37, 103].

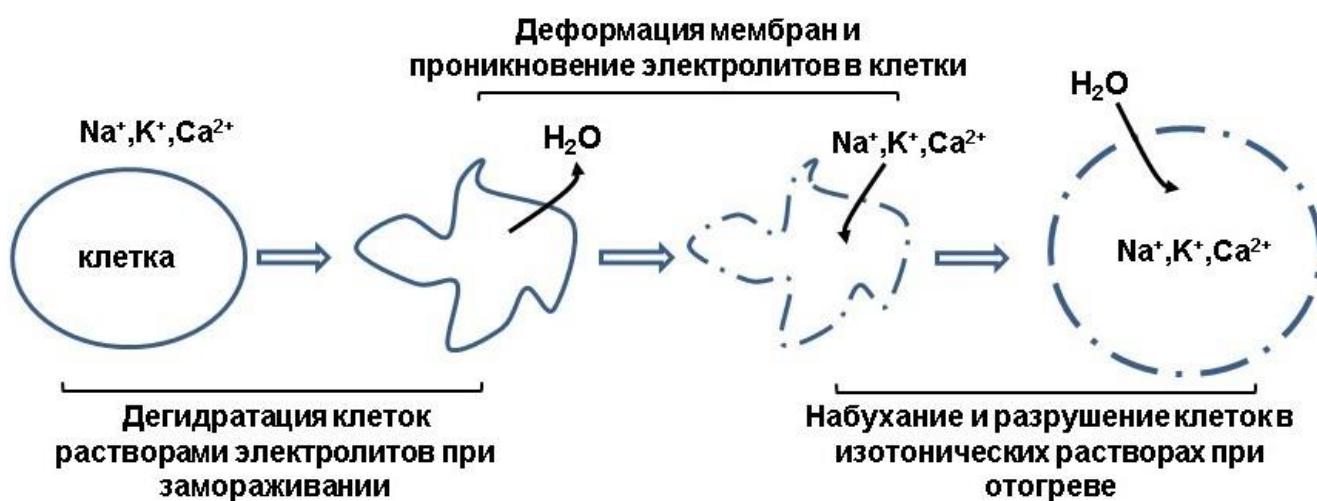


Рисунок 4 - Гипертонический лизис клеток во время криоконсервации

1.3 Криопротекторы и ограждающие растворы для консервации

Для предотвращения негативных явлений, развивающихся при воздействии холода, были разработаны различные способы гипотермической консервации, которые подразделяются на ультранизкотемпературные – охлаждение от $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже, консервация в условиях глубокой гипотермии от 0 до $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Первые обеспечивают длительное и надежное хранение, однако требовательны к наличию специальной аппаратуры, вторые, наоборот, не предъявляют специальных условий хранения, ограничиваясь использованием бытового холодильника, а для получения $0 - +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ достаточно температуры тающего льда. Однако срок хранения таких образцов в значительной степени ограничен, ввиду недостаточной остановки метаболизма.

Общими этапами гипотермической консервации для большинства используемых способов являются подготовка биообъекта - замещение нормальной окружающей среды клеток

криопротектором или ограждающим раствором; глубокое или умеренное охлаждение суспензии клеток; длительное хранение в условиях глубокой гипотермии ($0 - +4^{\circ}\text{C}$), или ультранизких температур (от -78°C до -196°C); размораживание.

Нет никаких сомнений в том, что специфические манипуляции и доработка каждого из перечисленных этапов могут иметь положительный эффект в уменьшении повреждений, развивающихся при гипотермической консервации. Однако главные заслуги в этой области принадлежат консервирующим растворам (криофилактикам) - криопротекторам или ограждающим растворам. Так, криопротекторы используются для уменьшения повреждений при ультранизкотемпературном хранении (клетки и биоматериал), в то время как специальные ограждающие растворы находят применение при консервации в зоне околонулевых температур (органы и ткани).

Все консервирующие растворы принято подразделять на вещества, проникающие через мембрану клеток, и непроникающие. Принято считать, что вещества с молекулярной массой 342 дальтон способны проникать через мембраны клеток, если масса вещества больше, то вещество не сможет проникнуть в клетку. Однако это деление достаточно условно и может зависеть от множества факторов, среди которых температура, ригидность мембран, тип клеток и т.д. [54]. К классу консервирующих веществ относится достаточно большая группа соединений – амиды, спирты, полисахариды, белки, гликоли, имеющие различные проникающие характеристики [38, 56].

Так, при хранении Эр используют многокомпонентный раствор ЦФДА -1, состоящий из различных по молекулярной массе веществ. Некоторые из них обладают проникающим действием через клеточную мембрану, другие нет. В целом раствор ЦФДА-1 не относится к классу проникающих криопротекторов и не может быть использован для ультранизкотемпературной консервации. Так же к классу непроникающих криопротекторов относятся растворы ПЭГ (полиэтиленгликоль), ПЭО (полиэтиленоксид), ПЭА (полиэтиленалкоголь), декстраны, сахара и относительно недавно открытые специальные протеины AFP (Anti freeze proteins) [63, 113, 140, 155], выделенные из обитателей глубинных слоев мирового океана. Перечисленные вещества не могут защитить клетки от разрушающего действия холода, при использовании ультранизких температур ($-78 -196^{\circ}\text{C}$), однако они находят широкое применение с целью консервации при умеренной гипотермии ($0 - +4^{\circ}\text{C}$) или в составе комплексных растворов для криоконсервации.

В ситуации, когда имеется необходимость надежной и длительной криоконсервации биообъекта, требуется использование растворов проникающих криопротекторов, таких как спирты - диметилсульфоксид (ДМСО) или глицерин. Криозащитный эффект данных веществ известен с 1949 года [65, 136, 137, 170]. Механизм их проникающего действия основан на

взаимодействии с липидами или белками мембран, последующем проникновении в микрокапиллярную систему клетки с циркуляцией в ней и взаимодействием с клеточными компартментами [123, 146, 171, 172]. Считается, что защитное действие проникающих криопротекторов основано на способности данных веществ связывать молекулы вне- и внутриклеточной воды, снижая тем самым точку кристаллизации воды. Поэтому нивелируется гиперосмотический эффект холодового повреждения на этапе замораживания.

При дальнейшем снижении температур происходит кристаллизация (гексагональный лед) или витрификация (аморфный лед) вне- и внутриклеточного содержимого с закономерным снижением энергии активации всех молекул и остановкой большинства биохимических реакций. Поэтому считается, что чем больше молекул находится в обездвиженном состоянии, под воздействием льда или стеклования – витрификации, тем дольше и надежнее консервируется объект. Уход в область радикально низких температур делает данные эффекты более выраженными. Описанные эффекты проникающих криопротекторов принято называть коллигативным свойством [112, 117]. При этом будет ли объект витрифицирован или кристаллизован, напрямую зависит от концентрации криопротектора в консервирующем растворе [98, 100, 101].

Существенные различия в качественных характеристиках ДМСО и глицерина, зачастую определяют предпочтения выбора каждого из них при необходимости консервации различных объектов. Так, ДМСО обладает повышенной скоростью проникновения в клетки, до 20 раз более быстрой, чем глицерин [116, 118]. Так же показано, что температура, необходимая для проникновения ДМСО в клетку, не играет существенной роли, поэтому данную процедуру можно проделывать даже при 0 °С, уменьшая риск повреждения клеток вследствие токсического действия раствора [106, 149]. Напротив, для глицерина, чем выше температура инкубации, тем лучше и быстрее он проникает в клетки. Проникающий эффект глицерина практически исчезает при околонулевых температурах. Однако данный криопротектор сам по себе менее токсичен в сравнении с ДМСО. Наряду с этим, проникающий эффект ДМСО сильно зависит от вида консервируемой ткани, например, в ткани роговицы данный криопротектор проникает в 4 раза медленнее, чем в почечную или панкреатическую ткань [168]. Также имеются данные о продолжении его накопления внутри клеток и тканей после достижения равновесных концентраций во вне- и внутриклеточной среде [95, 130].

Таким образом, когда речь идет о непроникающих ограждающих растворах, предполагается защитное действие последних в диапазонах около- и нулевых температур. Используя проникающие криопротекторы, в случае правильно подобранной концентрации (10% и выше), можно добиться криозащитного действия в диапазонах действия

умереннонизких и ультранизких температур. Выбор температуры хранения очень важен, так как от него в большей степени зависят сроки и эффективность консервации.

1.4 Побочные эффекты консервирующих растворов

Известные консервирующие растворы, помимо защитного действия, имеют ряд известных недостатков. Так, в случае использования непроникающих веществ основная проблема состоит в ограниченности сроков хранения при использовании таких консервирующих агентов. Например, срок хранения эритроцитов в растворе ЦФДА-1 колеблется от 14 до 42 суток. Это в первую очередь связано с тем, что клетки хранятся в состоянии глубокой гипотермии (0, +4 °C). С одной стороны, они не подвергаются кристаллизации, следовательно, большая часть механизмов холодового повреждения, таких как механическое повреждение или гипертонический шок, не может воздействовать на них. С другой стороны, жидкая фракция вне- и внутриклеточной воды, хотя с замедленной скоростью, все же выступает благоприятной средой для протекания биохимических реакций.

Главным врагом живой клетки в таких условиях являются различные виды окислительного стресса, вызванного присутствием активных форм кислорода (АФК). Особенное значение в данном случае имеет перекисное окисление липидов (ПОЛ) биологических мембран, вследствие которого происходит разрушение клеток. Последнее обусловлено тем, что механизмы антиоксидантной защиты в условиях пониженной температуры не в состоянии адекватно нейтрализовывать свободные радикалы и не могут в полной мере обеспечить защиту, особенно при температурах, близких к 0 °C. Таким образом, малое количество АФК, требуемое для активации процесса, стимулирует образование начальных количеств липоперекисей, в дальнейшем порочный круг замыкается, так как уже окисленные липиды продолжают воздействовать на новые – неокисленные соединения. Процесс продолжается до момента терминального повреждения мембраны. Особенную интенсивность данные механизмы могут приобретать в безъядерных клетках, например, в эритроцитах (Эр) [74, 154, 158] (рисунок 5).

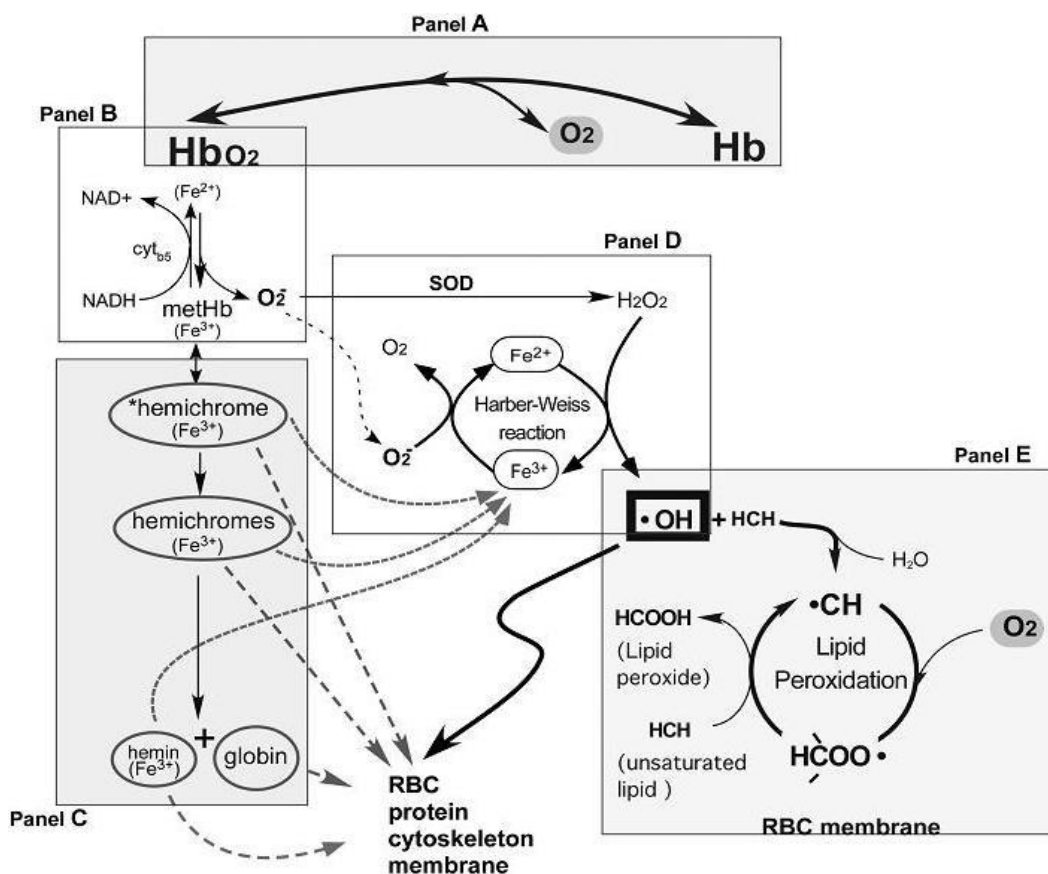


Рисунок 5 - Пути окисления эритроцитов (Т. Yoshida, S.S. Shevkoplyas, 2010). Панель А- оксигенация гемоглобина. Панель В-переход гемоглобина в окисленную форму (метгемоглобин) с образованием супероксид радикала (в норме от 1-5 % Эр). Панель С- распад гемоглобина на окисленный гем (Fe^{3+}) и глобин. Панель D- реакция Харбера-Вейса в цитоплазме Эр – фермент супероксиддисмутаза инактивирует O_2^- , с образованием перекиси - H_2O_2 , которая с участием Fe^{2+} образует HO^- радикалы, в дополнении к избытку гема, полученного из панели С. Е- перекисное окисление липидов (ПОЛ), протекающее с участием молекулярного O_2 и липид радикалов CH^- , которые образуются при окислении жирных кислот HO^- , липид радикал окисляет интактные фосфолипиды (HCH) с образованием нового радикала – порочный круг замыкается

В случае использования проникающих криопротекторов – ДМСО или глицерина, сроки хранения клеток могут быть практически неограниченными в том случае, когда осуществляется хранение при температуре жидкого азота. Однако ряд негативных эффектов, характерных для данных веществ, ставит под сомнение вопрос их широкого применения. Так, добавление ДМСО представляет собой экзотермическую реакцию, которая является дополнительным повреждающим фактором [165]. В дополнении к этому, применение стандартного протокола криоконсервации с использованием ДМСО не позволяет полностью исключить формирование

крупнокристаллического льда и последующее вытеснение клеток кристаллами льда в гиперконцентрированные солевые каналы [4, 9].

Внесение ДМСО может оказывать отрицательное влияние так же на реципиента. В литературе имеются многочисленные сообщения о неблагоприятных реакциях при инфузиях костного мозга и периферических стволовых клеток, при консервации которых в качестве криоконсерванта был использован ДМСО. После введения клеток, предварительно обработанных данными криопротекторами, описаны случаи нарушения психики и сознания, головные боли, тошнота и диспепсические явления [1, 70, 109, 121, 150, 165]. Кроме того, ДМСО способен вызывать нежелательную преждевременную дифференцировку стволовых клеток, выступая в качестве вектора для цитокинов или стимулировать апоптоз. Наряду с этим, данные криопротекторы способны приводить к изменению экспрессии целого ряда генов, таких как *sxcr4b* - рецептор хемокинов, *rou5f1* - октамер связывающий фактор 3/4 (ОСТ3/4), *vasa* - кодирующий основной белок геликаз, *sox2* [59, 133, 157]. Означенное ставит под сомнение возможность широкого клинического использования данного криофиликтика.

Наряду с этим, когда речь заходит о проникающих криозащитных агентах, таких как ДМСО или глицерин необходимо учитывать дополнительный повреждающий фактор, который появляется на этапе расконсервации и последующего отмывания клеток от консервирующего раствора. Данный механизм называется постгипертонический лизис клеток, который напрямую связан с проникающим действием таких криофиликтиков как ДМСО или глицерин (рисунок 6).

Обработка данными криопротекторами создает гипертоническую среду внутри клеток, которая способствует повышению осмотического давления и вода, необходимая на этапе расконсервации в качестве отмывочного раствора, оказывается внутри клеток по градиенту концентрации. Далее клетки увеличиваются в размерах пока осмотическое давление вне- и внутри них не выровняется. Очевидно, что часть клеток, особенно с ригидными мембранами, может быть разрушена [37].

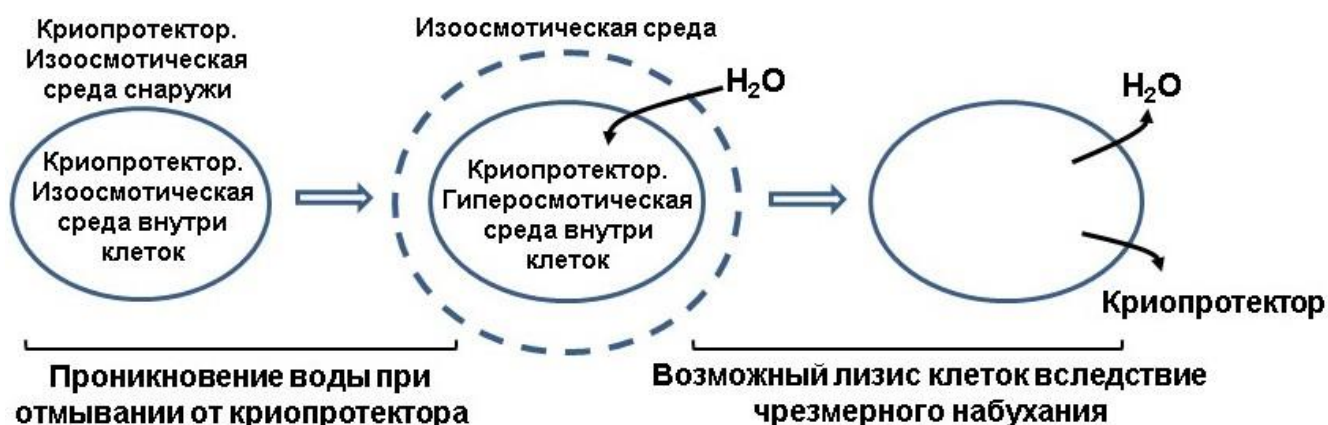


Рисунок 6 - Постгипертонический лизис клеток во время отмывания клеток от криопротектора

С целью минимизации данного эффекта в традиционных протоколах криоконсервации с использованием ДМСО или глицерина рекомендуется использовать постепенно снижающиеся концентрации гипертонических отмывочных растворов. Однако в такой ситуации клетки будут подвержены механическим повреждениям в результате многократных процедур афереза и регулярных манипуляций оператора-лаборанта, хотя использование данного метода предпочтительнее, чем полный отказ от него.

Таким образом, в современной криобиологической практике отсутствуют единые подходы к сохранению различных видов клеток, тканей или органов. Как правило для клеток используется некий «золотой стандарт» - это ДМСО в конечной концентрации 10 % в сочетании ультранизкотемпературной заморозкой (от -78 до -196 °C), а также, для усиления криопротективного эффекта, могут быть использованы различные добавки и биоантиоксиданты.

Ввиду неравномерности распределения криофилактика и, следовательно, повышенного риска развития криповреждений и механического повреждения для органов и тканей, с целью дальнейшего клинического использования применяются солевые ограждающие растворы и хранение в условиях глубокой гипотермии при 0 - +4 °C. Последнее, безусловно, предполагает значительное сокращение сроков консервации - не более 10 суток для тканей и 24 часов для органов, однако позволяет нивелировать как вышеперечисленные эффекты, так и токсическое действие проникающих криофилактиков на клетки консервируемого биообъекта. Возможно поэтому в традиционной медицине отдают предпочтение пусть не столь длительному, но надежному и проверенному методу хранения в глубокой гипотермии. Так, с помощью данного метода сегодня хранят роговичные или кожные эксплантаты, а также все виды органов [85, 93, 159]. В то же время криоконсервация пока что находит свое применение только в научной области, а также для консервации клеток с целью клеточной терапии.

Следует особо подчеркнуть, что для консервации клеток периферической крови, наиболее применимым и востребованным до сих пор считается метод гипотермического хранения в ограждающем растворе ЦФДА-1, несмотря на ограниченные сроки хранения и наличие валидированных способов ультранизкотемпературного хранения в растворе глицерина [14]. Последний используется только для консервации стратегических запасов крови и не нашел распространения в клинике из-за необходимости отмывания от гемоглобина после расконсервации. Раствор ДМСО для консервации крови и ее компонентов не рекомендован к использованию ни в каком виде, по-видимому, по причине множества вышеперечисленных побочных эффектов.

Таким образом, там и когда речь заходит о практическом применении и о работе с большим количеством пациентов врачи стремятся максимально уйти от нежелательных

побочных явлений, которые могут быть вызваны применением того или иного криофилактика, поэтому при необходимости выбора между сроком консервации или качеством биообъекта, предпочтение отдается последнему. И только в случае относительно редких патологий, требующих применения заместительной клеточной терапии, придерживаются ультранизкотемпературных способов хранения (криоконсервации). Безусловно, немаловажную роль в процессе выбора так же играет недостаточная обеспеченность клиник аппаратурой для ультранизкотемпературного хранения.

1.5 Новые способы консервации биообъектов

В ежегодном докладе, представленном ассоциацией биобанков Европы совместно с Всемирным обществом криобиологов в 2013 году были обозначены основные принципы перспективных исследований в сфере консервации биообъектов для целей практической медицины. Основным из них стало создание, совершенствование и внедрение методов консервации биообъектов в условиях умеренно низких температур. Безусловно, повышение допустимых температур хранения, в первую очередь скажется на сроках консервации, однако биобанки и клиницисты готовы идти на такие жертвы, чтобы минимизировать количество некачественного биоматериала, которое образуется в результате применения стандартных протоколов. Наряду с этим, там, где это возможно - оказаться от традиционных методов хранения в жидком азоте, ввиду больших затрат и труднодоступности оснащения.

Поэтому в последнее время интерес криобиологов направлен на изучение и поиск новых способов консервации, обладающих минимальными побочными эффектами или ограничивающих использование ультранизких температур. Среди них можно выделить два основных направления: совершенствование методов консервации с помощью известных криофилактиков и поиск новых консервирующих агентов; применение принципиально новых способов, основанных на использовании других механизмов защиты от холодовых повреждений.

Локомотивом первого направления выступает витрификация. Она предполагает использование больших концентраций известных криофилактиков по отдельности или в комбинации с целью максимально быстрого и надежного стеклования – витрификации биообъекта. Последнее, практически в полной степени исключает явления гипертонического шока клеток, так как основная цель витрификации – одномоментное стеклование во всей толще биообъекта. Наиболее известные работы в этой области принадлежат G.M. Fahy, который впервые витрифицировал и удачно разморозил почку кролика, с последующей пересадкой и сохранением функциональной активности [99, 104, 134]. На основе его работ в Японии была

разработана техника витрификации ооцитов и эмбрионов, которая сегодня находит широкое применение во всем мире [97, 108, 153]. Однако данные, касающиеся успешной витрификации относительно крупных объектов, например, почки человека до сих пор отсутствуют. Это может свидетельствовать о неравномерности проникновения криопротектора в объемную ткань и, как следствие недостаточности криозащиты [29]. Так же проблемными местами витрификации, являются использование высоких концентраций известных криопротекторов, в том числе ДМСО (до 40 %) и необходимость хранения в диапазонах ультранизких температур – от -78°C и ниже. При этом, предельно допустимой концентрацией ДМСО в рутинной криобиологической практике считается 10 %, очевидно, что даже при незначительном нарушении временных режимов экспозиции или отмывания от витрифицирующих растворов происходит немедленная гибель клеточного объекта благодаря известным токсическим свойствам данного раствора. В этом случае уже не имеет значения насколько быстро и эффективно был витрифицирован биообъект.

Задачей поиска новых криопротективных агентов является отказ от традиционных ДМСО-содержащих растворов и их замена на непроникающие вещества, например, полиолы или протеины. Широкую известность в данном направлении получили *anti freeze proteins (AFP)* и поливинилалкоголь. К настоящему времени у данных веществ не выявлено серьезных побочных эффектов, а их способность консервировать клетки выглядит достаточно обнадеживающей. К тому же требуемые температуры хранения для обеспечения надежной консервации с помощью данных веществ начинаются от -20°C . Проблемным локусом этих веществ является их неспособность легко проходить трансмембранный барьер и, как следствие, возможные эффекты внутриклеточной кристаллизации, которые в некоторой степени снижают перечисленные достоинства. Наряду с этим отсутствуют данные, касающиеся применения этих веществ с целью хранения относительно больших биообъектов, таких как ткань или орган. Возможно и тут могут быть проблемы, в первую очередь связанные со слабым пенетрирующим эффектом данных веществ.

Другое направление развития криобиологии и биобанкирования – это разработка и применение принципиально новых методов консервации. В настоящее время интерес исследователей направлен в сторону разработки и совершенствования двух различных техник консервации.

Первая называется CAS (*cell alive system*) - замораживание [28]. Она основана на использовании переменного магнитного поля различной частоты с целью воздействия на консервируемый биообъект и параллельной заморозки [78, 79, 81, 82, 84, 92]. Согласно данного принципа, молекулы воды в биообъекте приходят в движение с помощью энергии магнитного поля и, тем самым препятствуют процессу детерминированной нуклеации с образованием

традиционного «ледяного фронта». Таким образом, объект замораживается более равномерно, как будто «во всем объеме». Несмотря на позитивные данные, касающиеся заморозки отдельных видов пищевых продуктов (корень васаби, мясо, рыба) и сохранением их первозданных органолептических свойств, технология CAS в медицине, стоит только в начале пути.

В работах [79, 81, 83, 84] показана возможность низкотемпературной консервации с помощью CAS - метода супензий ЭСК, ММСК и остеобластов. Однако во всех случаях в качестве дополнительного фактора был использован 10 % раствор ДМСО, хотя в сочетании с CAS результаты были несколько лучше. Таким образом, не совсем ясно, что в большей степени провоцирует криозащитный эффект в данном случае – традиционный криопротектор ДМСО или способ CAS. Вместе с тем очевидно, что для сохранения пищевых продуктов могли быть использованы куда более высокие частоты электромагнитного воздействия, чем возможно применить на живых клетках, без гибели последних. Возможно поэтому способ консервации пищевых продуктов с помощью CAS, с одной стороны выглядит обнадеживающим, а с другой не может быть беспрепятственно экстраполирован на живые клетки, сохранение функциональной активности которых является первостепенной задачей для целей практической медицины и биобанкинга.

Другим интересным направлением создания принципиально новых методов консервации биологических объектов является использование инертных газов. Гипотеза консервирующего действия инертных газов основана на образовании особенных соединений этих газов со свободной водой как внутри, так и в околоклеточном пространстве биообъекта. Такие соединения называются клатратами. Имеются предположения, что данные соединения иммобилизуют воду и блокируют протекание большинства метаболических реакций [8, 10, 19, 31, 39-47, 51, 142, 148, 167, 177].

Важно отметить, что у данного способа есть определенные преимущества перед другими техниками консервации. Во-первых, инертные газы нетоксичны и некоторые из них уже сейчас хорошо зарекомендовали себя в медицине, например, в качестве компонента наркотической дыхательной смеси в анестезиологии [71, 88, 96]. Так же они успешно используются для купирования синдрома отмены в токсикологии [6, 55]. Во-вторых, некоторые из этих газов, например, ксенон (Xe) обладают достаточным проникающим эффектом, что позволяет насыщать весь биообъект соответствующим газом [31, 51]. Последнее обстоятельство позволяет предположить исключение механизмов неравномерной консервации и связанных с ней повреждений. В-третьих, равномерное насыщение консервируемого биообъекта нужным газом возможно благодаря механизму равновесной экстракции, в результате которого газ с большим парциальным давлением замещает газы с меньшим [33-35]. Это может исключить

присутствие кислорода и создать инертные условия, тем самым препятствуя протеканию процессов свободнорадикального окисления.

Недостатками метода, пожалуй, можно считать сочетанное воздействие умеренного гипербарического и гипотермического факторов, которые необходимы для успешной консервации. Однако убедительные данные, касающиеся негативного воздействия подобных факторов на консервируемые биообъекты, в доступной литературе, в настоящее время, отсутствуют. Наоборот, были зафиксированы значительные органопротекторные и нейропротекторные эффекты ксенона при системном использовании [94, 107, 125, 127, 139, 160, 161, 173-176]. Так же известно, что последний обладает способностью к образованию клатратов при атмосферном давлении и глубокой гипотермии ($-3,8 - 0^{\circ}\text{C}$) [27, 47, 52, 77]. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что консервация в инертных газах может найти применение, как с целью продления сроков консервации крупных биообъектов – тканей или органов, так и улучшения качества консервированных биообъектов. Поэтому, исследования и разработки в данной области могут носить перспективный характер для практического здравоохранения.

1.6 Консервация с использованием инертных газов

Идея использования клатратов инертных газов с целью консервации была сформулирована в конце 60х годов XX-го века [138] и в дальнейшем получила развитие в работах ученых школы известного отечественного трансплантолога академика В.И. Шумакова [5, 25, 58]. Тогда вдохновением для большинства исследователей – криобиологов и трансплантологов стали работы Л. Полинга, в которых описывалась гипотеза молекулярной теории наркоза, основанной на механизмах образования микрокристаллогидратов инертных газов в мембранах клеток и последующем блокировании синаптических контактов между ними [12, 49, 132].

Существенный вклад в представления о механизмах действия клатратов на биообъекты внесла супрамолекулярная химия, одним из разделов которой является изучение структуры и свойств клатратов газов [2, 15, 16, 30, 126, 135]. Клатраты газов (газовые гидраты) – это соединения газа с водой, образованные воздействием нехимической связи - ван-дер-ваальсовых сил. Такое соединение содержит молекулу гостя – атомы газа, окруженную кристаллической решеткой хозяина – молекулы воды (рисунок 7).

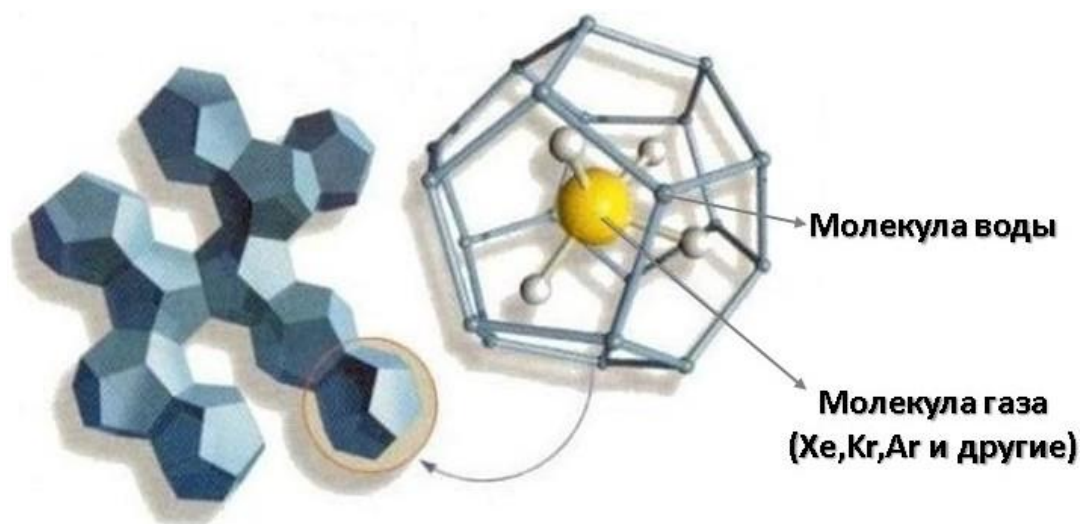


Рисунок 7 - Молекулярная структура газовых гидратов

Клатраты газов известны с давних времен. Первые сообщения об идентификации клатрата хлора с водой датированы началом IX века [102, 163]. В дальнейшем стало известно, что клатраты могут быть образованы практически любым видом газа при его взаимодействии с водой. Так были открыты клатраты метана, которые сегодня представляют серьезную проблему в нефтегазодобывающей промышленности из-за обструкции трубопроводов при транспортировке углеводородов [105]. Глобальным открытием стало известие о том, что порядка 7 трлн. тонн метана заключены в клатраты и содержатся в глубинных слоях мирового океана [76]. Наряду с этим известно, что большие залежи клатратов различных газов находятся в районах вечной мерзлоты.

Общим свойством практически всех газов является способность к образованию клатратов при достаточных термобарических условиях [126, 135]. При этом известно, что чем больше атомарная масса газа, тем меньшее давление требуется использовать, для образования клатрата при одинаковых температурных условиях. Так, клатраты хлора с водой образуются при атмосферном давлении и температуре 16 °С. Для образования клатратов кислорода с водой при таких термических условиях потребуется давление в несколько десятков мПа. Однако атомарные массы не единственное свойство, определяющее способность газов к образованию клатратов. Предполагается, что существенную роль в этом процессе могут играть размеры самих молекул, а также характер взаимодействия газа с водой – гидрофильный или гидрофобный.

Существует несколько типов геометрических структур – полостей, которые образуют гидраты различных газов. Так, первый тип (Тип 1) состоит из 46 молекул воды, которые образуют два различных варианта клатратных решеток – 2 малых и 6 больших. Малые имеют форму додекаэдра, в то время как большие геометрически похожи на тетрадодекаэдр.

Типичные для этого типа решеток молекулы гости – CO_2 или метан. Второй тип полостей (тип 2) состоит из 136 молекул воды и формирует 16 малых и 8 больших решеток. Малые, как и в предыдущем случае, имеют геометрическую форму додекаэдра, а большие образуют гексадодекаэдры. Гостями тут могут быть O_2 и N_2 . Третий - заключительный тип конструкции (тип Н) состоит из 36 молекул, которые, способны формировать три типа решеток – две малые различных типов и одну большую. Тут 3 малых решеток первого типа, 2 малых второго типа и 1 «гигантская» решетка 3 типа. Образование клатратных решеток типа Н требует включения нескольких гостевых молекул газов, например, O_2 и CO_2 . Образование данных полостей с водой можно инициировать с помощью воздействия определенным газом и подбором специальных термобарических условий, необходимых для образования клатратов конкретных газов.

Применение клатратов с целью консервации тесно связано с двумя факторами: их способностью к иммобилизации воды, а также известным фактом, что живые клетки более чем на 70 % состоят из нее [15, 16, 30]. Так, в работах В. В. Родина с соавторами показана способность клатратов Хе радикально снижать энергию активации протонов в связанных клатратом диполях воды [10, 31, 39, 41]. Данный показатель служит в качестве индикатора подвижности и реакционной способности вещества. В работах [19, 40, 47] показано, что энергия активации протонов в клатрированных растворах ДНК-связанная вода, а также растворов протеинов с водой была сопоставима с таковой для молекул обычного гексагонального льда.

Другой особенностью клатратов может быть отсутствие детерминированных центров кристаллизации и, как следствие, «ледяного фронта», который всегда направлен от источника холода к центру замораживаемого объекта. Описанные ранее механизмы дегидратации и механического воздействия, связанные с присутствием такого фронта, в достаточной степени раскрывают его патогенное действие (рисунок 3,4). В клатратной консервации, по достижении определенных температурных условий и насыщении клеток требуемым газом, они практически одновременно подвергаются клатрированию. При этом известно, что клатратный лед имеет меньшую плотность, иную кристаллическую структуру, поэтому может быть менее губительным для биообъектов [20]. Макроскопически клатраты больше напоминают прессованный снег, который сильно отличается от ледяного монолита [2, 30].

Очевидно, что инертные газы ввиду своих химических свойств – отсутствия реакционной способности с биомолекулами, а также возможности к образованию клатратов выглядят привлекательным инструментом для целей биологической консервации. К настоящему времени с целью консервации были использованы как смесь инертных газов [52, 126], так и чистые тяжелые инертные газы – ксенон, аргон, криптон [21, 22, 50, 90, 148, 162].

Необходимым условием образования клатратов является растворимость газа. Известно, что все инертные газы гидрофобны в нормальных условиях, а их растворимость в воде определяется как величиной парциального давления, так и атомарной массой самого газа [33-35]. Самую большую массу из всех инертных газов, за исключением радиоактивного радона имеет Хе. Это позволяет ему хорошо растворяться в воде и биологических жидкостях в умеренных термобарических условиях [19, 31, 40-42, 47]. Последнее свойство инициирует относительно облегченное, в сравнении с другими инертными газами, свойство к образованию клатратов, которое может быть достигнуто даже при атмосферном давлении. Поэтому использование чистого Хе для целей биобанкинга может быть более выгодным, чем применение других инертных газов или их смесей.

Ранее были проведены работы по исследованию клатратов инертных газов с целью консервации прокариотов - суспензий бактерий *E. Coli* [39, 44, 46]. В проведенных исследованиях была впервые показана принципиальная возможность сохранения клеток при образовании и разрушении клатратов, а также выявлены соотношения количества клатрированной внеклеточной и внутриклеточной части воды.

В следующем исследовании была показана возможность краткосрочной криоконсервации в клатратах смеси инертных газов сердца мышцы *in situ* [27]. В работе изучалось влияние смеси газов – ксенон, криптон, аргон в гипербарических условиях на организм животного и последующее охлаждение до температур жидкого азота. Было зарегистрировано восстановление краткосрочной сократительной активности сердца, после размораживания животного.

В работе [22] было исследовано состояние митохондриального матрикса и целостность их мембран после криоконсервации изолированных мышечных сердец с использованием гипербарической атмосферы ксенона. Изучаемые характеристики сравнивались с контрольной группой, в которой проводились одинаковые манипуляции с использованием гипербарической и нормобарической атмосферы азота. Было показано отсутствие серьезных нарушений целостности мембран и потери митохондриального матрикса в тканях опытной группы.

В работе [148] было исследовано воздействие гипербарической атмосферы Хе на хранение монослоев культур адгезированных фибробластов при воздействии умеренной гипотермии - +4 °C. Показано положительное влияние 60 часовой экспозиции клеток с гипербарией Хе в глубокой гипотермии на их способность к поглощению и трансформации тетразолиевых солей после консервации. Активность клеток, консервированных в ксеноне, была на 50 – 75 % выше, чем контрольных культур.

Интересные данные получены в другой работе [126], в которой исследовалось воздействие газированных различными инертными газами растворов для консервации органов

и последующее гипотермическое хранение последних при $+4^{\circ}\text{C}$. Показано, что экспозиция изолированных донорских почечных трансплантатов в ограждающих растворах, которые были насыщены Хе или криптоном, существенно увеличивает количество жизнеспособных клеток в консервируемом органе, а также снижает число отсроченных отторжений.

В работе [29] исследовалась жизнеспособность трансплантатов яичниковой ткани, криоконсервированной с использованием клатратов Хе. Показано значительное консервирующее влияние примененных условий Хе, которое выражалось в восстановлении функций расконсервированной яичниковой ткани после трансплантации под париетальную брюшину.

Последние исследования в данной области включают консервацию в клатратах специфических клеточных линий [21] и лейкоцитов периферической крови [50, 90, 162]. При изолированном использовании гипербарии Хе и ультранизкотемпературного хранения было показано значительное разрушение клеток. Однако, при криоконсервации лейкоцитов в гипербарии Хе в сочетании со стандартно используемым раствором ДМСО, удалось получить большее количество жизнеспособных клеток.

Анализ проведенных исследований и использованных способов демонстрирует, что до сих пор отсутствует единый подход к использованию инертных газов с целью гипотермической консервации и данное направление по-прежнему является плацдармом для новых экспериментов. Так, в зависимости от использованных условий, применение Хе при различных термобарических параметрах с целью консервации биообъектов может быть расценено по-разному. Например, Хе может образовывать клатраты с биообъектами, находящимися в глубокой гипотермии как при гипербарических условиях – 6 атм. при $+4^{\circ}\text{C}$, так и в нормобарии – 0 атм. при $-3,8^{\circ}\text{C}$. С другой стороны, в качестве консерванта может быть использована гипербарическая атмосфера Хе без образования клатратов, например, при создании условий избыточного давления в 1-3 атм. и воздействии гипотермии от $+4^{\circ}\text{C}$ и выше.

Так в работах Tatsuro Yoshida [86, 158] была использована гипербарическая атмосфера криптона с целью воздействия на суспензию Эр в гипотермических условиях ($+4^{\circ}\text{C}$). Теоретические предпосылки данного способа основаны на способности инертных газов к накоплению в липидах мембран ввиду большой растворимости в них и механизмов равновесной абсорбции [12, 13, 33, 34]. По-видимому, это может создавать что-то наподобие «инертного щита» вокруг клеток, который не дает возможности протекания реакций свободнорадикального окисления. Однако в данном случае необходимо учитывать, что наряду с блокированием образования АФК могут быть остановлены реакции электрон-транспортной цепи, необходимые для существования большинства клеток.

Таким образом, в доступной литературе показана принципиальная возможность использования инертных газов с целью консервации различных биообъектов. Однако имеющихся данных явно недостаточно для подтверждения функциональной сохранности консервированных биообъектов. Имеющийся научный задел в данном направлении ограничен методами витальной окраски и визуализации с помощью микроскопии различного разрешения. Нет сведений, касающихся сравнения гипербарического воздействия Хе с образованием клатратов и без таковых. Отсутствуют какие-либо данные о токсичности ксенона в условиях культуры клеток и тканей, эффектов ксенона на свойства клеток, технологии клатратного консервирования (оборудование, условия, температурные и временные режимы и т.п.), эффективности ксенон-клатратного консервирования тканей.

Означенное послужило основанием к проведению работы по всестороннему исследованию различных режимов консервации с использованием Хе на клеточном и тканевом уровнях. Постановка такой проблемы может помочь расширить представления о патогенетических механизмах сочетанного воздействия, умеренного холодового фактора и клатратообразования или гипербарии на клетки и ткани во время консервации, а также послужить обоснованием дальнейшего использования исследованных методик на более высоких уровнях организации живой материи, например, с целью консервации органов или организмов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика экспериментального материала

2.1.1 Характеристика эритроцитов

Эритроциты получали от 8-ми здоровых доноров мужчин в возрасте 18 – 25 лет с помощью процедуры венепункции после оформления информированного согласия (ИС) в ГОБУЗ «ЦГКБ» г. Екатеринбурга. Эр собирали в вакуумные пробирки с ЭДТА (vacutainer). Все образцы разделяли на плазму и форменные элементы методом афереза на центрифуге (Sigma 3К30) при 1950 g в течение 3 минут и при 25 °С. Супернатант (содержащий плазму и ее компоненты) и верхний лейкоцитарный слой заменяли эквивалентным объемом PBS. Клетки хранили не более 7 суток до использования. Далее готовили 200 мкл аликвоты эритроцитов и помещали в поликарбонатные криопробирки Nalgene Cryo (Nunc). Образцы случайным образом разделяли на группы. Всего было исследовано 63 образца, по 9 в каждой группе. Распределение представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Распределение образцов Эр в группах исследования

№ группы	Способ консервации	Количество образцов, n
1	ЦФДА-1	9
2	Гипербария Хе + ЦФДА-1	9
3	Гипербария Хе	9
4	Клатраты Хе	9
5	Клатраты Хе + ЦФДА-1	9
6	Интактные Эр	9
7	Негативный контроль	9

В первой группе (контроль) Эр консервировали согласно модифицированного стандартного протокола хранения. Для этого соответствующие аликвоты Эр смешивали с консервирующим раствором – Фаглюцидом (аналог ЦФДА-1), полученным из пакетов для переливания крови (Медсинтез, Россия) из расчета 50 мкл консерванта на 200 мкл эритроцитов, согласно инструкции производителя (1:4). Во второй группе Эр консервировали путем сочетанного воздействия гипербарической атмосферы Хе и стандартного гемоконсерванта ЦФДА-1. В третьей группе Эр консервировали в гипербарической атмосфере Хе, в отсутствии

ЦФДА-1. В четвертой группе Эр консервировали в условиях образования изолированных клатратов Хе. В пятой группе консервация Эр осуществлялась путем образования клатратов Хе в растворе с ЦФДА-1. В шестой группе Эр не подвергались хранению и воздействию любых консервантов, основные контролируемые параметры клеток измерялись немедленно после венепункции. В седьмой группе хранение Эр происходило в течение установленного срока для других опытных групп в отсутствии каких-либо консервантов.

Согласно рекомендации производителя стандартного консервирующего раствора Фаглюцид (ЦФДА-1) для консервации крови, диапазон сроков хранения Эр в данном растворе составляет от 21 до 42 суток при $+4^{\circ}\text{C}$, однако на практике, гемотрансфузиологи не используют кровь максимального срока хранения, предпочитая более свежие образцы. Поэтому во всех исследуемых группах был выбран 30-ти суточный период хранения Эр, в качестве среднего показателя.

2.1.2 Общая характеристика лабораторных животных

Кожные лоскуты необходимые для экспериментов по оценке макро- и микроскопической сохранности консервированных тканей, а также для экспериментов по исследованию применимости различных способов консервации с целью аутотрансплантации были получены с дорсальной поверхности проксимальной части хвостов беспородных белых крыс-самцов, в возрасте 6-9 месяцев, массой 250-350 г. Всего было исследовано 28 животных, по семь особей в каждой группе. Распределение животных по сериям экспериментов представлено в таблице 2. Животных содержали в стандартных условиях вивария, предусмотренных «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с положениями Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, методическими рекомендациями по выведению из опыта и эвтаназии.

Таблица 2 - Распределение животных в группах исследования

№ группы	Способ консервации	Количество животных, n
1	Интактная кожа	7
2	ДМСО	7
3	Гипербария Хе	7
4	Клатраты Хе	7

Во всех группах исследования забирали (эксплантировали) полнослойные кожные лоскуты, содержащие выраженные эпидермальный и дермальный слои, гиподерм - подкожная жировая клетчатка во всех образцах практически отсутствовала. Лоскуты эксплантировали методом иссечения с помощью скальпеля. С целью соблюдения одинакового размера экспериментального биоматериала во всех опытных группах, на картонной бумаге вырезали прямоугольник с длинной сторон $0,8 \times 0,5$ см, который использовался в качестве трафарета.

Первая группа являлась контрольной, в которой не проводилось какой-либо консервации и хранения эксплантированных кожных лоскутов. В данной группе кожные лоскуты немедленно после эксплантации пересаживали на вновь образованное раневое ложе. Таким образом, производился перенос лоскута с одного участка на другой в пределах одного хвоста. При этом лоскуты трансплантировали, изменяя ориентацию ткани в раневом ложе, ориентируясь по направлению роста волос. Во второй группе эксплантированные лоскуты консервировали с помощью стандартного криопротектора – 10% диметилсульфоксида (ДМСО). В третьей группе были использованы кожные лоскуты, которые хранились в гипербарической атмосфере Хе. В четвертой группе были использованы лоскуты, консервированные в клатратах Хе.

2.1.3 Общая характеристика тканей, использованных для оценки морфофункциональных характеристик

Кожные лоскуты, использованные для оценки эффективности различных методов консервации в отношении экспансивной активности фибробластов дермы и сохранности кератиноцитов, были эксплантированы с передней брюшной стенки здоровых доноров в возрасте 40-55 лет, в рамках операций по иссечению грыж после оформления информированных согласий пациентов в рамках протоколов, одобренных ЛЭК УГМУ, в ГОБУЗ «ЦГКБ» г. Екатеринбурга. Кожные эксплантаты площадью 10 мм^2 инкубировали в культуральной среде, содержащей антибиотиков в стандартных культуральных концентрациях, для предотвращения возможной контаминации в течение 12 ч. Далее эксплантаты от каждого донора подвергались отделению собственно кожи от ПЖК, после этого их рассекали на 10 равновеликих кожных лоскута размером $0,5 \times 0,2$ см. В исследовании использовали 56 кожных лоскутов примерно одинакового размера для проведения экспериментов. Материал разделяли на 2 части, состоящие из одинакового количества лоскутов по 28 в каждой группе. Одна часть направлялась на исследование динамики экспансии фибробластов после различных техник хранения, другая – на исследование сохранности кератиноцитов и митохондриального аппарата нуклеарных клеток кожи с помощью проведения теста поглощения и трансформации

тетразолиевых солей в кристаллы формазана (МТТ тест). Распределение образцов по сериям экспериментов представлено в таблице 3.

Таблица 3 - Распределение кожных лоскутов в группах (сериях исследования)

№ группы	МТТ тест	Экспансия фибробластов	Всего лоскутов, n
	Способ консервации		
1	Интактная кожа		14
Количество лоскутов, n	7	7	
2	ДМСО		14
Количество лоскутов, n	7	7	
3	Гипербария Хе		14
Количество лоскутов, n	7	7	
4	Клатраты Хе		14
Количество лоскутов, n	7	7	

В первой группе (контроль) кожные лоскуты сразу после эксплантации подвергали трем различным исследованиям – МТТ тест, экспансия, гистологическое исследование. В группах 2-4, после получения образцов производили консервацию согласно установленных протоколов с использованием ДМСО, или с помощью создания различных условий Хе – хранение в гипербарической атмосфере или клатратное хранение. Образцы опытных групп расконсервировали через 7 суток и проводили исследования, аналогичные контрольной группе.

2.1.4 Криоконсервация кожных лоскутов в ДМСО (диметилсульфоксид) и отогрев

Для криоконсервации кожных лоскутов готовили консервирующий раствор - смесь криопротектора ДМСО, в стандартной концентрации 10 % в среде RPMI-1640. Ткань погружали в криопробирки Nalgene Cryo (Nunc) и добавляли 1 мл консервирующего раствора. Далее пробирки плотно закручивали крышкой и проводили экспозицию на -84 °С в течение 7 суток в механическом морозильнике (Sanyo) и контейнере с изопропиловым спиртом (MrFrosty, Nalgene). Последний позволяет производить заморозку со скоростью 1°С/мин.

Расконсервацию – отогрев образцов производили на водяной бане (Biosan wb-4ms) при 37 °С и постоянном покачивании в течение 5 минут. После отогрева все образцы двукратно отмывали в растворе PBS и далее проводили исследования.

2.1.5 Характеристика клеток, использованных в исследовании. Получение первичной культуры. Субкультивирование.

Культуру адгезирующих клеток фибробластического дифферона различной степени зрелости или фибробластоподобных клеток (ФК) получали из полнослойных кожных лоскутов передней брюшной стенки здоровых доноров, в возрасте 40 – 50 лет, после процедуры оформления добровольных информированных согласий в процессе операций по иссечению грыжи передней брюшной стенки. В асептических условиях операционной их помещали в стерильные пробирки и доставляли в лабораторию при +4⁰C. Кожные эксплантаты инкубировали в транспортировочной среде, содержащей антибиотики в стандартных культуральных концентрациях для предотвращения возможной контаминации. С целью накопления достаточного количества ФК для экспериментов по оценке воздействия различных способов консервации на синтетическую и пролиферативную активность проводили ферментативную дезагрегацию и субкультивирование.

Выделение ФК из полученных образцов производили согласно стандартного протокола в условиях ламинарного бокса 2-го класса защиты («Ламинар-С») [157].

Эксплантаты механически дезагрегировали скальпелем на кусочки ткани размером приблизительно 1 мм². Затем каждый из образцов ткани помещали в равном объеме фосфатного буфера с двукратной концентрацией пенициллина/стрептомицина (PBS + 2xPEST): пенициллина (200 ед./мл) и стрептомицина (200 мкг/мл), соответственно.

Далее образцы центрифугировали при ускорении 250 g при +4⁰C (Sigma, 3K30) в течение 5 минут, супернатант удаляли. Затем в образцы добавляли 25 мл PBS + 1xPEST, центрифугировали при 250 g при +4⁰C в течение 5 минут, супернатант удаляли.

Далее образцы переносили в 25 мл среды DMEM с низкой концентрацией глюкозы, содержащей 0,584 г/л глутамина (Sigma Aldrich), однократную концентрацию пенициллина/стрептомицина (100 ед./мл + 100 мкг/мл соответственно) (DMEM-Lg+1xPEST) и 1% коллагеназы грубой очистки с активностью не менее 1200 CDU/мг (Sigma Aldrich). Образцы помещали в инкубатор на автоматический шейкер на 120 минут при 60 об/мин. Далее объем образцов доводили до 50 мл средой DMEM-Lg+1xPEST содержащей 10% FBS (DMEM-Lg+1xPEST+10%FBS), ресуспендировали и фильтровали через фильтр типа Cell Strainer с размером пор 70 мкм для удаления клеточного дебриса.

Полученные суспензии центрифугировали при ускорении 250 g при +4⁰C в течение 5 минут. Надосадок удаляли и ресуспендировали в 1 мл среды DMEM-Lg+1xPEST+10%FBS. Количество и жизнеспособность клеток подсчитывали по стандартной методике с 0,4% раствором трипанового синего в камере Фукса-Розенталя. Клетки ресуспендировали в среде

DMEM-Lg+1xPEST+10%FBS и рассевали в 25 см² вентилируемые флаконы для работы с адгезивными клетками (TPP) с плотностью посева 5×10^5 жизнеспособных клеток на флакон (первый пассаж = П1). Спустя сутки неприкрепленные клетки удаляли со сменой среды. Далее клетки культивировали до достижения 70% конфлюэнтности в инкубаторе (Sanyo) при 37°C и 5% CO₂ со сменой среды и фазово-контрастной микроскопией (Olympus CKX) каждые 3 дня.

После достижения 70% конфлюэнтности клетки диссоциировали 0,25 % раствором трипсина-ЭДТА (Sigma Aldrich, T4049), нейтрализовали средой DMEM-Lg+1xPEST+10%FBS, центрифугировали при ускорении 250 g в течение 5 минут. Надсадок удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл среды DMEM-Lg+1xPEST+10%FBS и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Далее клетки рассевали в 75 см² вентилируемые флаконы для работы с адгезивными клетками (TPP, 90075) с плотностью посева $6,5 \times 10^5$ клеток на флакон (П2). Клетки культивировали до достижения 70% конфлюэнтности при 37°C и 5% CO₂ со сменой среды и фазово-контрастной микроскопией каждые 3 суток. Первичная культура фибробластоподобных клеток имела следующие характеристики:

1. концентрация клеток $1,8-2,1 \times 10^6$ клеток/флакон; (или $24-28,3 \times 10^3$ клеток/см²);
2. жизнеспособность 87-91%.
3. Морфология культуры: при цитологическом исследовании культур контрольной группы была выявлена слабая морфологическая гетерогенность. Основой полученных культур являлись фибробластоподобные и полигональные клетки с разной степенью дифференцировки и преобладанием бластных функциональноактивных клеток. Культура была представлена крупными клетками отростчатой, веретеновидной и округлой форм. Отмечались клетки с хорошо контурированным ядром, многочисленными отростками и выраженными клеточными контактами. Количество ядрышек не превышало двух. Клетки с признаками дистрофии единичны (рисунок 8).

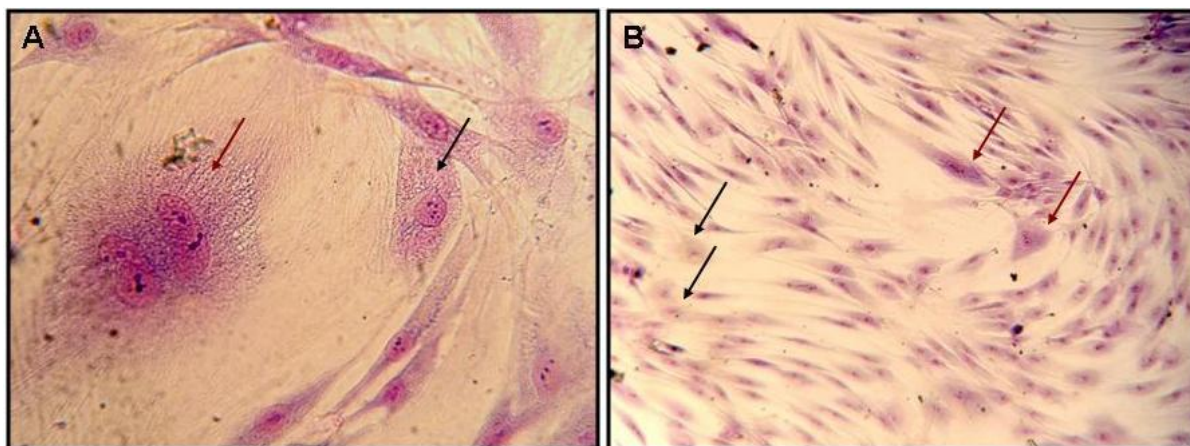


Рисунок 8 - Первичная культура клеток фибробластического дифферона, выделенных из полнослойного кожного лоскута. А – увеличение в 400 раз. В – Увеличение в 100 раз. Красными стрелками указаны ФК, черными стрелками указаны эпителиальные клетки

Для экспериментов использовали культивированные в вентилируемых флаконах ФК не позднее 5-6 пассажа, достигшие конfluenceности 75-80%. Флаконы были случайным образом поделены на группы – распределение представлено в таблице 4.

Таблица 4 - Распределение опытных и контрольных культур клеток по группам

№ группы	Способ консервации	Число культур	
		Адгезированные клетки	Суспензированные клетки
1	Интактные клетки	7	7
2	Клатраты Хе	7	7
3	Гипербария Хе	7	7
4	DMSO 10%	7	7

Ввиду того, что все культуры ФК обладали свойством адгезии для экспериментов с клетками, находящимися в суспензированном состоянии использовали способ поддержания клеток в неадгезированном состоянии. Для этого эксперименты с ними проводили немедленно после снятия клеток с поверхности 25 см² флаконов и разведения их в 1 мл среды DMEM и помещения суспензии в 2 мл криопробирки Nalgene Cryo (Nunc), не давая возможности закрепиться на поверхности пластика.

В группах адгезированных культур клетки высевали на чашки Петри (TPP) диаметром 40 мм в начальной посевной концентрации 10×10^4 жизнеспособных клеток на чашку. Далее давали клеткам прикрепиться в 5% CO₂ при 37⁰C в течение 6 часов. После этого начинали эксперименты с адгезированными культурами.

Контрольные культуры – интактные клетки не подвергались какой-либо консервации и инкубировались без обработки ксеноном в течение 48 часов при температуре 37 C⁰, после чего немедленно исследовались. В группах с клатратами Хе или гипербария Хе пробирки с клетками помещали в герметичный контейнер с окнами из оргстекла и инкубировали при 0 - +4 C⁰ при различных давлениях Хе в течение 48 часов с визуальным контролем образования или отсутствия Хе клатратов (см. отдельный раздел).

В четвертой группе ФК 5-6 пассажа были криоконсервированы согласно стандартного протокола в полной среде с 10% DMSO в концентрации $6,5 \times 10^5$ кл/мл на минус 84 ⁰C в течение 48 часов в механическом морозильнике (Sanyo) и контейнере с изопропиловым спиртом (MrFrosty, Nalgene), для равномерного охлаждения.

Отогрев суспензированных для криоконсервации культур клеток производили на водяной бане и однократно отмывали в полной среде, подсчитывали жизнеспособность клеток и

рассеивали в 25 см² вентилируемые флаконы для работы с адгезированными клетками (ТТР) с плотностью посева $6,5 \times 10^5$ клеток на флакон. Адгезированные культуры исследовали немедленно после отогрева, без процедуры пересева.

Подсчет клеток в камере Фукс-Розенталя

При необходимости подсчета клеток для проведения исследований, во всех случаях придерживались методики подсчета в камере Фукс – Розенталя. Последовательность действий состояла из следующих шагов:

Подготовка суспензий:

1. Готовили клеточную суспензию.

Если культура была адгезивной, то снимали клетки с поверхности культурального флакона с помощью стандартной методики трипсинизации.

2. Центрифугировали суспензию при 250g 5 минут, сливали супернатант.
3. Тщательно ресуспензировали клетки в 1 мл культуральной среды DMEM или фосфатного буфера PBS.
4. Переносили из пробирки с клеточной суспензией в новую пробирку пробу для подсчета клеток – 50 мкл.

Подсчет клеток:

1. Пипетировали пробу для подсчета клеток.
2. Заполняли пробой камеру Фукс-Розенталя.
3. Клетки, в зависимости от количества, считали в 1 или в 2 рядах малых квадратов. Полученный результат умножали на 16 или 8, соответственно. Таким образом, находили количество клеток в 3,2 мкл (объем камеры). Подсчет повторяли несколько раз до получения не менее 10 статистически достоверных результатов. Далее находили среднеарифметическое значение.

4. Общее количество клеток находили по формуле: $X = (1000 * A) / 3,2$, где X – общее количество клеток, 1000 – общий объем суспензии клеток (мкл), A – среднеарифметическое количество клеток в камере, 3,2 – объем камеры Фукс-Розенталя.

5. При необходимости подсчета жизнеспособных/нежизнеспособных клеток производили окраску клеточной суспензии трипановым синим, по стандартной методике [53].

2.2 Гипербарическая и клатратная консервация в Хе

С целью создания условий гипербарической консервации в Хе или хранения биообъектов в клатратах Хе использовали способ воздействия на консервируемые биообъекты в закрытой герметичной емкости путем создания различных давлений инертного газа при гипотермии $+4^{\circ}\text{C}$. Схема процесса представлена на рисунке 9.

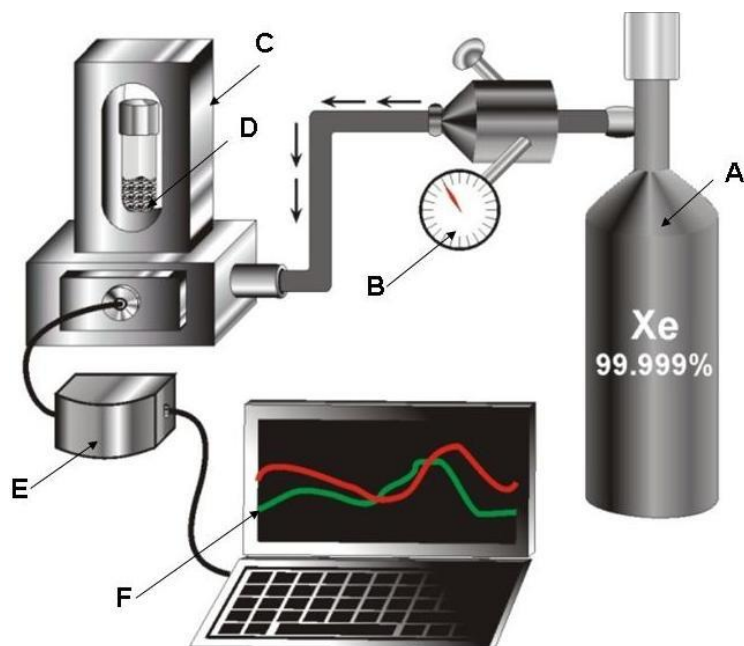


Рисунок 9 - Схема консервации биообъектов в различных гипербарических условиях Хе. А – газ ксенон 99,999% чистоты. В – Редуктор подачи газа. С – Прибор для консервации. D – Пробирка с консервируемым объектом (клетки, ткань). Е – Контроллер преобразования и передачи данных. F – ПК и программа регистрации параметров консервации биообъектов

В общем виде процесс консервации биообъектов в Хе начинается с помещения биообъекта – клеток или тканей в криопробирки (D). Далее пробирки помещают в прибор для консервации (C), в который нагнетается избыточное давление газа Хе (A) с помощью редуктора (B). Для создания гипербарической атмосферы величина избыточного давления не превышала 3 атм, с целью консервации биообъекта в клатратах Хе требуемое давление Хе должно быть не менее 6 атм.

После создания требуемой гипербарии, прибор помещался в стационарный холодильник при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Далее, с помощью датчиков, встроенных в прибор, происходило считывание контрольных параметров консервации – давления и температуры консервируемого биообъекта. Считанная информация, с помощью контроллера (E) передавалась в специально разработанную программу для ПК (F) – Registrator, в которой происходила запись лог-файлов консервации. Общий вид программы представлен на рисунке 10.

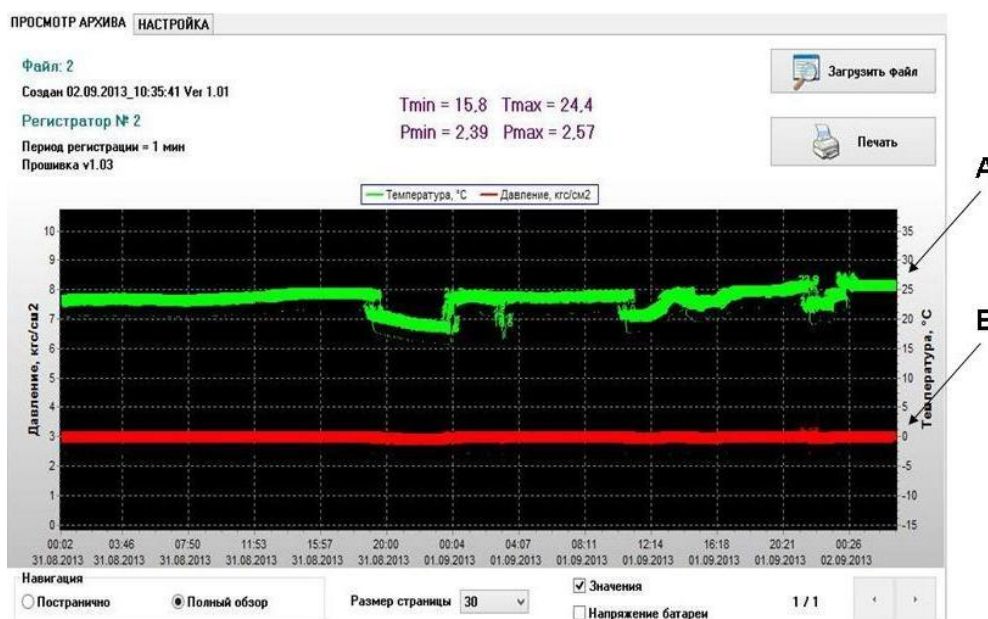


Рисунок 10 - Программа для регистрации и записи лог-файлов консервации для ПЭВМ - Registrator. А – Линия, отображающая значения температуры с течением времени. В – Линия, отображающая изменение давления с течением времени

2.2.1 Описание устройства для консервации в гипербарии и клатратах Хе

Для проведения экспериментов были разработаны различные варианты специальных приборов, которые позволяют в замкнутом объеме рабочих камер различного объема (от 20 см³ до 150 см³) получать гипербарии подаваемых газов до 10 атм. и сохранять заданное давление с потерями не более 0,1 атм. в сутки. Устройства снабжены универсальным портом для подачи в камеру Хе или других газов, а также оснащены датчиками измерения давления и температуры (дискретность измерения температуры = 0,1 °C, максимальная абсолютная погрешность измерения температуры в пределах от -10 до +85 ± 0,5 °C, максимальная абсолютная погрешность измерения давления ± 0,25 кгс/см²).

Часть приборов были оборудованы прозрачными окнами из оргстекла для наблюдения за поведением консервируемых образцов и моментом образования клатратов Хе в образцах. Рабочая камера приборов позволяет разместить в них 1,8 мл криопробирки (Nalgene) в количестве до 18 штук. На рисунке 11 представлены различные варианты исполнения приборов для консервации биообъектов в клатратах или гипербарии Хе, разработанные в рамках проведенных исследований.

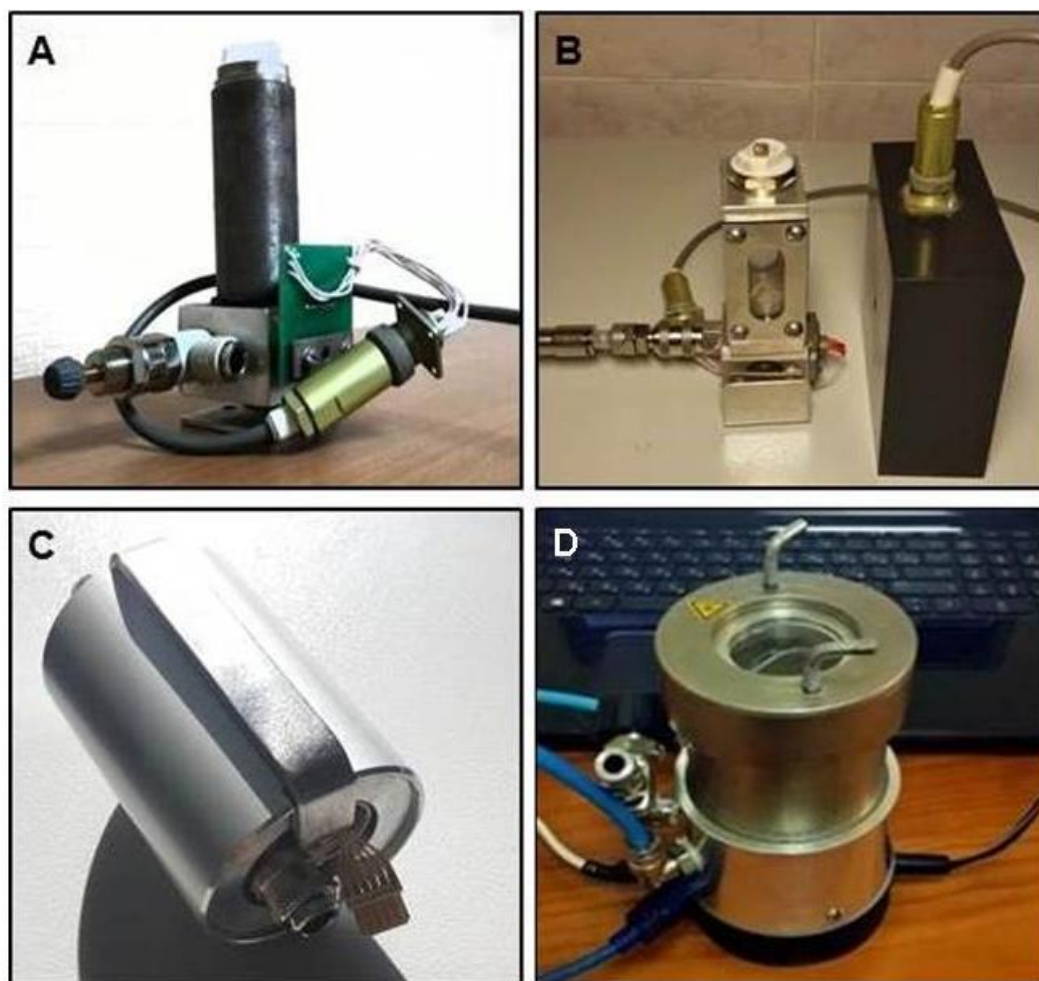


Рисунок 11 - Общий вид приборов для консервации в гипербарии или клатратах Хе. А – прибор без визуализации образцов. В – Прибор с визуализацией образцов (клатратообразование) во время консервации. С – Прибор, с визуализацией образцов, вмещающий до 18 экспериментальных криопробирок. D – Прибор, с визуализацией образцов, вмещающий до 18 экспериментальных криопробирок с возможностью автономного охлаждения внутреннего объема

Прибор для консервации, хранения и транспортировки биообъектов, изображенный на рисунке 11D содержит теплоизолированный корпус с патрубком, основанием и крышкой, выполненной с возможностью закрывания с образованием герметичной камеры, аккумулятор, микроконтроллер и подключенные к нему датчик температуры, датчик давления и средство охлаждения контейнера, при этом патрубок герметично соединяется с трубопроводом для подачи и отвода газов. Микроконтроллер выполнен с возможностью взаимодействия с внешней ЭВМ, например, ПЭВМ с помощью программы Registrator. При этом крышка снабжена смотровым окном, выполненным из термостойкого прозрачного материала – органического стекла. Схематичное изображение прибора в различных проекциях изображено на рисунке 12.

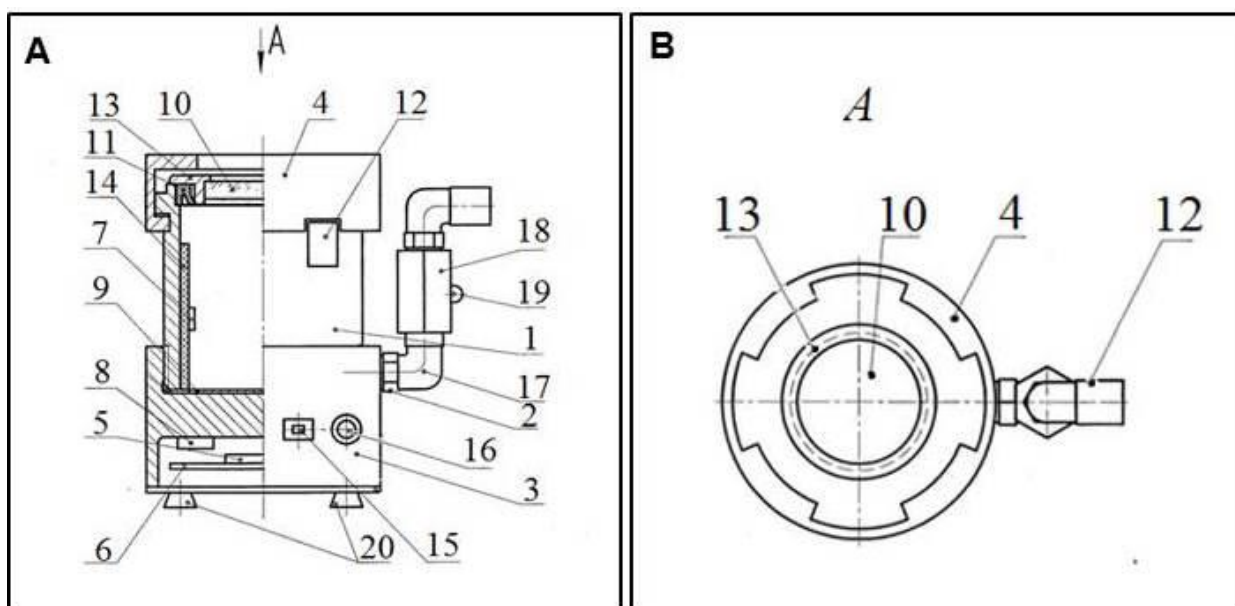


Рисунок 12 - Схематичное изображение приборов для консервации в гипербарии или клатратах Хе. А – вид сбоку в разрезе. В – Вид сверху

Основание корпуса сделано полым, при этом аккумулятор, микроконтроллер, средство охлаждения прибора размещены внутри.

Устройство охлаждения прибора и микроконтроллер имеют возможность подключения к внешнему источнику питания, а также внутри основания может быть размещен, по крайней мере, один дополнительный аккумулятор, предназначенный для их резервного питания. Средство охлаждения прибора выполнено в виде элемента Пельтье – это позволяет быстро достигать заданных значений температуры. Датчики температуры и давления находятся на корпусе внутри камеры.

Прибор содержит теплоизолированный корпус 1 цилиндрической формы с патрубком 2, полым основанием 3 и крышкой 4, выполненной с возможностью закрывания с образованием герметичной камеры, аккумулятор 5, микроконтроллер 6, выполненный с возможностью взаимодействия с внешней ЭВМ (схематично изображен на рисунке 1Е), и подключенные к микроконтроллеру 6 элемент Пельтье 9, датчик температуры 7 и датчик давления 8.

С целью обеспечения герметичности крышка 4 содержит уплотнительное устройство 11 манжетного типа и закрывается с помощью фиксатора 12. Так же крышка содержит смотровое окно 10 с металлической оправой 13, которое выполнено из органического стекла.

Корпус 1 выполнен из алюминия, что с одной стороны позволяет ему выдерживать высокое давление, с другой легко снимается с основания и автоклавируется с целью соблюдения условий асептики. С внутренней стороны корпуса имеется теплоизолирующий материал 14, в качестве которого был использован полиуретан.

Микроконтроллер 6 выполнен с возможностью подключения к внешнему источнику питания и ПЭВМ (не показаны на чертежах) с помощью разъема 15, выполненного в виде разъема USB.

Трубопровод для подачи и отвода газов представляет собой фитинг 17 с обратным клапаном 18 и регулятором потока газа 19. Прибор размещается на опорах 20.

2.2.2 Принцип действия устройства

В приборе размещают биоматериал, закрывают крышку 4 с образованием герметичной камеры, подключают элемент Пельтье 9 и микроконтроллер 6 к внешнему источнику питания, с помощью трубопровода для подачи и отвода газов контейнера производят подачу ксенона 99,999% степенью чистоты и его откачку, тем самым повышая и понижая давление в контейнере. С помощью разъема 15 микроконтроллер 6 подключают к ПЭВМ. Аккумулятор 5 питает датчик температуры 7 и датчик давления 8, которые в свою очередь считывают показания температуры и давления и передают их в микроконтроллер 6. ПЭВМ с помощью программы Registrator считывает информацию с микроконтроллера 6 и отображает ее для пользователя. При необходимости с помощью разъема 16 аккумулятор 5 подключают к внешнему источнику питания для подзарядки.

Визуальный мониторинг с помощью смотрового окна 10 прибора для консервации биообъектов в Хе позволяет в процессе консервации отслеживать состояние биоматериала, необходимость произведения корректировок давления и температуры, полученных через микроконтроллер 6 с помощью ПЭВМ. Устройство и принцип действия запатентованы: патент № 149845.

2.2.3 Получение и визуализация клатратов ксенона в биообъектах. Декомпрессия (расконсервация) образцов

Контроль образования клатратов Хе осуществляли визуально, через прозрачные окна прибора. Опытным путем было определено, что момент образования клатратов в рабочей камере отмечался, начиная с давления ксенона ≥ 6 атм. при температуре $\leq +4,0$ °C. При этом через прозрачные окна наблюдались изменения состояния опытных образцов от жидкого - к прессованному снегу, через промежуточный этап замедления текучести (рисунок 13). С целью предотвращения образования клатратов, в образцах, консервированных в гипербарической атмосфере Хе, использовали давление не выше 3 атм. при температуре $\leq +4,0$ °C.

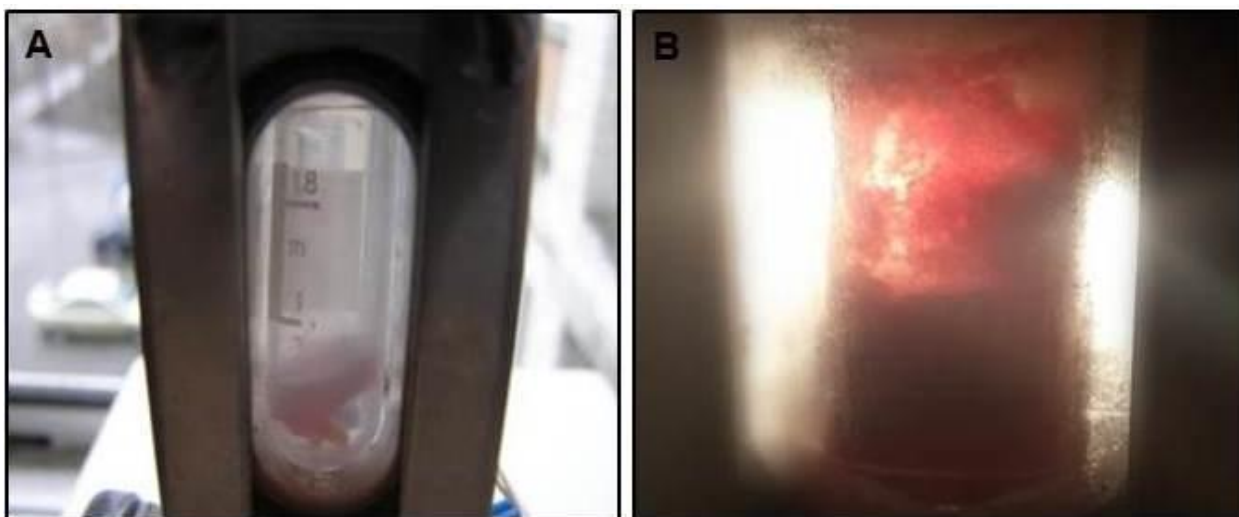


Рисунок 13 - Образование клатратов Хе – изменение агрегатного состояния воды в биообъектах во время консервации при $+4,0^{\circ}\text{C}$. А – консервация кожного лоскута в клатратах Хе. В – Консервация Эр в клатратах Хе

Расконсервацию проб проводили, сохраняя температуру в рабочей камере $+4,0^{\circ}\text{C}$, при этом придерживались протоколов медленной изотермической декомпрессии с промывкой чистым воздухом под давлением, полученных опытным путем. Теоретическая основа метода заключается в механизме равновесной абсорбции газа с меньшим парциальным давлением на газ с большим парциальным давлением [33-35]. Таким образом, для отмыwania растворенного ксенона, который заключен в клатраты, подавали чистый воздух через универсальный порт при давлении до 7 атм. По изменению агрегатного состояния – из твердого в жидкое, регистрировали окончание процесса разложения клатратов Хе, далее доводили температуру до комнатной, медленно спуская избыточное давление воздуха.

Образцы с гипербарией деконсервировали подобным образом, однако требуемое давление промывочного газа – чистого воздуха было существенно ниже и составляло не более 3 атм.

2.2.4 Используемые в экспериментах газы

Для экспериментов использовали технический ксенон высокой степени чистоты (99,9995% Iceblick ltd, ГОСТ – 10218-77) в литровом баллоне и технический воздух в качестве промывочного газа на этапах декомпрессии образцов (ЗАО ПТК «Криоген», ГОСТ – 17433-80, марка – 20,9) в 5-ти литровом баллоне. Газы подавались в рабочую камеру с помощью редуктора с манометром (GCE, 00/10) через универсальный порт, выполненный по типу быстроразъемного соединения (БРС).

2.3 Методы исследования жизнеспособности клеток и тканей

2.3.1 Расчет показателей гемолиза

Количество разрушенных Эр оценивали по уровню свободного гемоглобина в надосадочной жидкости, на спектрофотометре Ultrospec pro 1100 при длине волны 490 нм [156]. Гемолизированный раствор Эр получали добавлением 200 мкл бидистиллированной воды с двухкратным замораживанием при -84°C и оттаиванием. Результат абсорбции фиксировали и принимали за 100 процентов - абсолютный гемолизированный раствор Эр. В качестве контроля принимали абсорбцию негемолизированной смеси Эр с буферным раствором. Показатель гемолиза всех опытных групп, рассчитывали, как отношение среднего показателя абсорбции к показателю абсорбции для гемолизированных Эр и умножали на 100. Значения выражали в процентах.

2.3.2 Кондуктометрический метод оценки сохранности клеток

Для изучения характеристик консервированных Эр использовали кондуктометрический метод Культера, который основан на измерении амплитуды электрического сигнала при прохождении одиночной клеткой измерительного канала. Метод позволяет проводить измерение над одной клеткой, определяя интегральные значения. Для проведения измерений использовали гематологический анализатор 4го поколения Nihon Cohden. Принцип действия прибора основан на построении гистограмм на основании импеданса клеток. Для этого система прибора умножает число эритроцитов в каждом измерительном канале на размер эритроцитов, проходящих данный канал, затем суммирует полученные значения для всех каналов и делит сумму на общее число эритроцитов, умножает полученное значение на калибровочную константу и выражает средний объем клеток в фемтолитрах. Кроме объема, с помощью метода Культера определялись и такие морфофункциональные характеристики циркулирующего пула эритроцитов как их число, гематокрит, среднее содержание и средняя концентрация гемоглобина в эритроците [23]. Отдельного внимания заслуживает показатель, указывающий на гетерогенность объема Эр во всей консервируемой суспензии и являющийся расчетным показателем анизоцитоза. Таким образом, основными контролируемыми параметрами, которые измерялись с помощью данного способа в наших экспериментах были: средний объем Эр, среднее содержание Hb в Эр, среднее количество Эр, количество анизоцитов.

2.3.3 Исследование жизнеспособности клеток с помощью МТТ теста

Сохранность кератиноцитов эпидермиса кожных лоскутов оценивалась по способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать тетразолиевые соли (2,5-diphenyl – 2H – tetrazolium bromide) в кристаллы формазана, которые далее регистрируются полуколичественным способом.

Для проведения опытов готовили 1 мл аликвоты рабочих растворов МТТ stock solution - TOX1-1KT, In Vitro toxicology Assay Kit, МТТ based (Sigma aldrich). В качестве ПАВ для разрушения мембран клеток и растворения ткани использовали 10 % Triton X-100 в изопропанол (0,1 N HCl) (Sigma aldrich). Аликвоты МТТ stock solution добавляли в 9 мл PBS и получали МТТ working solution – рабочий раствор.

Крысу обезболивали 2 мл раствора Авертина, интраперитонеально и, с помощью скальпеля снимали кожу с хвоста крысы. Помещали кожный лоскут хвостовой части в раствор, содержащий PBS с 1xPEST. Далее производили эвтаназию животного. Инкубировали кожу в течение 12 часов на + 4 °C. Далее, в стерильных условиях ламинара с помощью заостренной металлической трубки диаметром 5 мм готовили 28 одинаковых полнослойных кожных лоскутов, по 7 в каждой группе.

В контрольной группе:

1. Помещали по одному лоскуту в отдельные лунки в 24-луночной планшете;
2. Наливали по 1 мл МТТ working solution в каждую лунку, так, чтобы раствор накрывал исследуемый кожный лоскут;
3. Помещали в инкубатор на 4 часа;
4. Извлекали и аккуратно удаляли жидкость из каждой лунки;
5. Заливали по 1 мл 10% Triton X-100 в изопропанол в каждую лунку с кожей;
6. Инкубировали кожные лоскуты 3 часа в условиях CO₂ инкубатора и 37 °C;
7. Собирали жидкость, содержащую трансформированные МТТ соли (формазан) из каждой лунки;
8. Центрифугировали при 600 g для осаждения клеточного дебриса и наливали в кювету для спектрофотометрии;
9. Измеряли абсорбцию раствора на спектрофотометре Ultrospec 1100 при длине волны 570 нм.

Эксперименты в опытных группах консервации в клатратах Xe, гипербарии Xe и 10% ДМСО проводили после отогрева – деконсервации образцов. Последовательность действий была аналогичной в контрольной группе.

2.3.4 Исследование способности тканей к экспансии фибробластов

Для исследования функциональной сохранности и жизнеспособности дермального слоя кожи использовали способ оценки количества экспансированных фибробластов в динамике на 1 мм протяженности среза исследуемого лоскута. С целью оценки экспансивного потенциала тканей использовали способ первичного эксплантата [53]. Принципом способа является экспозиция ткани в малом количестве насыщенной ростовой среды для стимулирования локомоторной и пролиферативной активности дермальных фибробластов.

Способ был модифицирован таким образом, чтобы производить подсчет экспансированных фибробластов относительно краевой поверхности среза лоскута на 1 мм среза. С данной целью, полученные эксплантаты кожных лоскутов с помощью скальпеля разрезали на равные фрагменты. В процессе культивирования через равные промежутки времени смотрели количество экспансированных фибробластов с каждой стороны кожных лоскутов. Далее значения складывали и делили на 4. Полученные результаты выражали в количестве экспансированных клеток на 1 мм среза ткани. Измерения проводили, начиная с 6 суток культивирования, подсчитывали количество клеток каждые 3 суток трижды (9, 12, 15 сутки).

2.3.5 Исследование жизнеспособности клеток с помощью окраски флуоресцентным красителем Life-Dead viability Kit

Известным недостатком способа окраски клеток раствором трипанового синего является невозможность визуализации состояния жизнеспособных клеток, так как, клетки, в которые краситель не проникает, не могут быть однозначно идентифицированы как жизнеспособные, являясь, по сути, функционально «мертвыми». Например, если нарушены синтетические или колониеобразующие функции, в отсутствии видимых морфологических повреждений цитоплазматических мембран. Означенное связано с тем, что трипановый синий является коллоидным раствором красителя и проникает через физические разрушенные мембраны по градиенту концентрации. Тем самым, устойчиво окрашиваются только мертвые клетки, которые не способны элиминировать его обратно при помощи системы активного транспорта.

Поэтому в нашем исследовании был использован флуоресцентный набор окраски живых и мертвых клеток Life-Dead Cytotoxicity Viability Kit (Life Technologies). Данный способ окраски отличается от трипанового синего тем, что в первую очередь, визуализирует живые клетки. Это достигается за счет молекулы кальцеина (Calcein), которая благодаря своим липофильным качествам может проникать через неповрежденную клеточную мембрану и далее, если в цитоплазме не нарушена активность внутриклеточных эстераз, то она

превращается в светящийся флуоресцеин. Таким образом, для реализации данного принципа требуются два условия: интактная цитоплазматическая мембрана и работоспособность систем клетки, обеспечивающих активный транспорт и гидролиз молекул в цитоплазме. Последнее так же может служить маркером сохранности функциональной активности. Наряду с этим, второй компонент раствора этидиум гомодимер – 1 действует по принципу трипанового синего и может проникнуть внутрь клетки только в случае повреждения мембраны. Технически метод основан на оценке светящихся микроскопических объектов на общем темном фоне препарата.

Для проведения экспериментов клетки снимали с культурального пластика, суспендировали в 1 мл чистой среды DMEM (Sigma, D6046), после чего центрифугировали при 150 g (Sigma, 3K30) и производили подсчет клеток в камере Фукс-Розенталя. Клетки рассевали в 35 мм чашки (TPP) с плотностью посева 5×10^4 жизнеспособных клеток на чашку. Чашки помещали в CO₂ инкубатор и через 6 часов оценивали клеточную адгезию. После чего сливали избыточное количество культуральной среды и добавляли 1 мл раствора DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, StemCell Technologies) для отмывания от остатков среды и сыворотки. Процедуру повторяли трижды. Далее сливали DPBS и производили обработку флуоресцентным красителем Life Dead viability Kit (Life technologies) согласно инструкции производителя. Суспензированные культуры обрабатывали красителем немедленно, после посева на чашки Петри, не давая им закрепиться.

Для визуализации использовали люминесцентный микроскоп - визуализатор ZOE Fluorescent cell imager (BIO-RAD) с полным набором люминесцентных светофильтров и диодной лампой, в качестве источника света возбуждения флюоресценции. Для визуализации Calcein AM использовали фильтр, пропускающий синий свет, который необходимо поглощать объекту, чтобы испускать зеленое свечение, характерное для метки FITC расположенной на Calcein AM. Для визуализации Ethd-1 использовали фильтр, пропускающий желтый свет, который подавался на метку RFP, расположенную на Ethd-1, чтобы она испускала красно-оранжевое свечение. Анализировали клетки при 200-кратном увеличении. Считали количество зеленых (живых) и красных (мертвых) клеток. Живые клетки выражали в процентах по отношению общему количеству клеток. С целью достоверности подсчета анализировали минимум 20 полей зрения в каждом образце и получали среднее количество клеток.

2.4 Исследование сохранности морфологических характеристик клеток и тканей

2.4.1 Методы окраски и морфометрия окрашенных препаратов клеток

С целью описания морфологических характеристик первичных культур и суспензий Эр препараты окрашивали с помощью красителя Романовского – Гимза (Sigma aldrich) согласно стандартной методики [53].

Морфологические характеристики Эр анализировали на микроскопе Olympus CX 41. Описывали форму и конфигурацию мембран Эр в трех полях зрения (не менее 1000 клеток) при увеличении в 200 раз. Патологические формы Эр - эхиноциты, шистоциты, акантоциты, и др. подсчитывали совместно и обозначали как пойкилоциты – клетки с измененной мембраной по типу различной выраженности «сморщивания» на всей поверхности или клетки со звездчатыми мембранами. Количество дегмацитов – Эр, с разрушенной мембраной по типу значительного локального повреждения - «надкушенные клетки», считали отдельно. Результаты выражали в процентах к общему количеству исследованных клеток.

Морфометрические характеристики и описание первичных культур ФК, полученных методом ферментативной дезагрегации проводили с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ 41. Описывали степень дифференцировки культуры, выраженность межклеточных контактов, наличие бластных функционально активных клеток, количество дегенеративных форм клеток. С целью характеристики морфологии отдельных клеток – описывали ядро, количество ядрышек и выраженность цитоплазматических отростков.

2.4.2 Методы окраски и морфометрия окрашенных препаратов тканей

С целью описания морфологических характеристик кожных лоскутов, консервированных различными способами, использовали два способа окраски: гематоксилин-эозин для изучения сохранности эпидермального слоя ткани и Вейгерт-Ван Гизон для исследования сохранности морфологических характеристик дермы. Готовили гистологические блоки путем заливки образцов в чистый парафин на приборе ЕС 350-1. Делали срезы тканей на дерматоме, депарафинизировали и производили окраску препаратов с помощью готовых наборов красителей (Bio-Optica Milano S.P.A.) на автоматическом приборе HMS 70, согласно общепринятых протоколов [24].

Оценку параметров жизнеспособности расконсервированной кожи по отношению к интактной проводили немедленно после расконсервации согласно способу [159]. В качестве

основных оценочных показателей использовали микроскопические критерии сохранности эпидермиса и дермы и выражали в баллах (таблица 5).

Таблица 5 - Микроскопические критерии сохранности кожных лоскутов

Гистологический критерий	Баллы		
	0	1	2
1) Целостность эпидермиса	Разрушен полностью. Много вакуолизированных кератиноцитов. Повреждены все слои	Частично разрушен. Мало вакуолей. Повреждение только поверхностных слоев	Норма
2) Эпидермально-дермальный контакт	Отсутствует, базальная мембрана разрушена	Частично сохранен, имеются участки разрушения	Сохранен полностью
3) Организация коллагеновых волокон	Аморфное вещество, отек дермы, некроз. Не контурируются и не прокрашиваются	Местами наблюдаются нарушения и дезорганизация	Норма
4) Наличие фибробластов, шт	10-20	20-30	более 30

Анализировали каждый лоскут по отдельности и подсчитывали максимальное количество баллов, которое набирали образцы в опытных группах по четырем исследуемым характеристикам, представленным в таблице 5.

2.4.3 Исследование мембран клеток с помощью метода сканирующей электронной микроскопии

Для изучения влияния образования клатратов и собственно хранения на ФК и Эр был использован метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). С помощью данного способа, с учетом возможностей конкретного аппарата Zeiss EVO - криостоллик с возможностью регулировки температур в диапазоне от + 40 °С до – 40 °С мы сохраняли устойчивость ксенон-клатратного льда в процессе микроскопической визуализации. Задачами данного эксперимента являлись визуализация структуры ксенон-клатратного льда и морфологического состояния

мембран, заключенных в него клеток. Данная часть работы была выполнена в рамках коллаборации с университетом Ольборга (Дания).

Для проведения экспериментов использовали 1 мл суспензии ФК в PBS с концентрацией $1,5 \times 10^6$ кл/мл или отмытых Эр в концентрации 5×10^9 кл/мл. Суспензии были разделены в две криопробирки типа Nalgene Cryo (Nunc) по 500 мкл соответственно. Одну из пробирок, без дополнительных манипуляций (негативный контроль) помещали в морозильник при -25°C на 16 часов. Вторую пробирку – опытная группа, консервировали в приборе согласно протокола хранения в клатратах Хе при $0 - +4^{\circ}\text{C}$, визуально фиксировали формирование клатратов (вид спрессованного снега). После этого прибор с образцом помещали в морозильник при -25°C на 16 часов. После инкубирования на холоду пробирку с клатратами Хе извлекали из прибора и транспортировали в термоконтейнере с предварительно охлаждёнными до -25°C аккумуляторами холода вместе с контрольным образцом.

Консервированные образцы поочередно помещали в сканирующий электронный микроскоп Zeiss EVO на предварительно охлажденный до -30°C криостол. По достижению необходимого параметра вакуума (порядка – 0,9 атм) анализировали структуру льда и состояние мембран клеток в образцах, плавно меняя температуру криостолка от -30° до $+4^{\circ}\text{C}$ и фиксируя наличие или отсутствие изменений структуры наблюдаемых биообъектов в пределах изучаемых температур.

2.5 Методы исследования функциональной сохранности клеток и тканей

2.5.1 Исследование осмотической резистентности Эр

Для определения эластичности мембран Эр и способности к растяжению использовали метод изучения осмотической резистентности Эр. Методика предполагает помещение исследуемых образцов в гипотонические растворы NaCl с постепенно уменьшающейся концентрацией с шагом в 0,1 % и последующую регистрацию количества гемолизированных Эр в исследуемой суспензии на спектрофотометре. Исследования проводили по стандартному протоколу [32]. Строили кривые осмотической резистентности для каждой исследуемой группы, на которых указывали зависимость количества гемолизированных Эр от величины осмолярности среды.

С целью получения объективных значений на графиках, полученных на заключительном этапе, с помощью построения математических функций вычисляли точку осмолярности среды,

необходимую для гемолиза 50 % Эр в исследуемых образцах – средняя осмотическая хрупкость Эр.

2.5.2 Изучение динамики приживаемости кожных лоскутов лабораторных животных на модели аутотрансплантации

Для изучения динамики приживаемости тканей использовали модификацию способа, предложенного Ö. Başaran et al [93]. В четырех группах сравнения оценивали качественные характеристики приживления консервированных различными способами кожных лоскутов. Для этого извлекали полнослойные лоскуты кожи с проксимальной части дорсальной поверхности хвостов крыс с помощью скальпеля, далее консервировали их одним из 3 способов: гипербария Хе, клатраты Хе или консервация в ДМСО и сравнивали с контрольной группой.

Кожные лоскуты контрольной группы представляли собой интактную кожу, которую сразу после эксплантации, помещали на то же место, предварительно развернув лоскут против нормального роста волос, с целью нарушения архитектоники мелких сосудов. Опытные группы консервировали согласно способов, описанных в разделе 2.1. Спустя семь суток в опытных группах производили расконсервацию тканей и трансплантировали во вновь организованное «свежее» раневое ложе, на соседнем к предыдущему, участке хвоста. При этом новообразованное раневое ложе соответствовало размерам консервированного лоскута, изъятых с другого участка хвоста.

После трансплантации кожные лоскуты фиксировались к интактным тканям раневого ложа. Далее производили наблюдение не менее 28 суток, используя контрольные точки фотодокументирования не реже одного раза в 7 суток. Основные документируемые параметры: адгезия, цвет и эластичность трансплантированных лоскутов.

Неоднозначность литературных данных по использованию различных способов фиксации трансплантатов в ране и их влияние на результат приживления, обусловили необходимость проведения дополнительного исследования, целью которого стал подбор оптимального способа фиксации лоскута. Эксперимент предусматривал два этапа:

1. Выяснение наилучшего способа фиксации трансплантированного кожного лоскута в раневом ложе хвоста крыс.
2. Проведение полномасштабного эксперимента на 28 особях (по 7 голов в 4 группах сравнения), в котором использованы способы фиксации для всех экспериментальных лоскутов, полученные на первом этапе.

Определение оптимального способа фиксации кожных лоскутов в раневом ложе

Дизайн исследования предусматривал извлечение по два одинаковых кожных лоскута с проксимальных частей дорсальной поверхности хвоста. Лоскуты меняли местами и трансплантировали в противоположные раневые ложа. Распределение животных и способы фиксации представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Распределение животных в группах исследования

№ группы	Способ фиксации кожного лоскута	Количество животных, п	Количество лоскутов, п
1	Клей БФ-6	3	6
2	Шелковая нить+ Клей БФ-6	3	6
3	Шелковая нить + давящая повязка	3	6

1) Фиксация с помощью раневого медицинского эпоксидного клея на спиртовой основе БФ-6 (Россия)

2) Фиксация с помощью шелковых нитей, используемых при проведении оперативных вмешательств в сочетании с клеем БФ-6.

3) Фиксация с помощью шелковых нитей, используемых при проведении оперативных вмешательств с последующим закрытием раневых поверхностей лейкопластырем и обмоткой хвоста бинтовой повязкой.

Если в первых двух группах использовался эпоксидный клей с проявлениями возможной токсичности, то в третьей группе была использована схема, применяемая в клинической комбустиологии в настоящее время – фиксация шелковой нитью с закрытием раневого дефекта плотной давящей повязкой.

Наблюдение за лоскутами продолжали в течение 28 суток с фотодокументированием результатов каждые 7 суток. Основными контролируемыми параметрами были адгезия, цвет и эластичность трансплантированных лоскутов. Парметры оценивали согласно бальной системы Ö. Başaran et al [93], представленной в таблицы 7.

Таблица 7 - Макроскопические параметры оценки трансплантированных кожных лоскутов

Параметр	Баллы		
	0	1	2
Адгезия	Лоскут отслоился от раны полностью	Частично отслоен	Прилежит к ране со всех сторон
Цвет	Черный	Серый или коричневый	Сопоставим с интактной кожей
Эластичность	Твердый и сухой	Грубый	Эластичный и гибкий

Оценку баллов производили на каждом трансплантированном лоскуте, по отдельным наблюдаемым параметрам, представленным в таблице 7 – выставляли балл в соответствии с установленными критериями. Далее, складывали параметры каждого исследованного лоскута и получали совокупность вариантов. Высчитывали среднее арифметическое значение и подвергали данные статистической обработке (таблица 8).

Таблица 8 - Сумма баллов макроскопических параметров кожи после трансплантации (оценка эффективности способа фиксации на 14 сутки)

Группа исследования	Клей БФ-6 (1)	Шелковая нить+ Клей БФ-6 (2)	Шелковая нить + повязка (3)
Средний балл	4,83±0,4	3,8±0,75*	3,6±0,51*

* - достоверные различия с группой 1 при $p \leq 0,05$

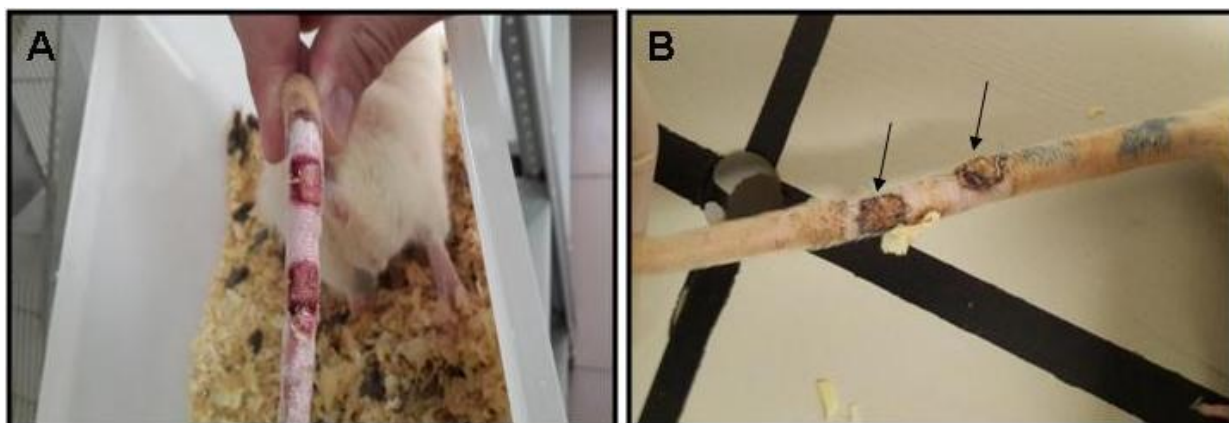


Рисунок 14 - Оценка показателей приживления лоскутов, фиксированных различными способами на 14 сутки трансплантации. А – фиксация с помощью клея БФ-6. В – фиксация с помощью нитей и давящей повязки (группа 3). Стрелками показаны огрубевшие трансплантаты

Из полученных результатов следует, что лучшие показатели демонстрирует метод фиксации с помощью клея БФ-6, без каких-либо дополнительных способов фиксации, таких как нить или повязка. На рисунке 14А заметно отсутствие грануляционного воспаления и некроза по краям трансплантированных лоскутов. Трансплантированная ткань находится под плотной полимеризованной пленкой клея, наблюдается лишь изменение окраски.

Напротив, в группе, в которой лоскут фиксировали нитями, наблюдалась воспалительная реакция в месте фиксации, а лоскуты были огрубевшими, с признаками некроза (рисунок 14В). По-видимому, это связано с тем, что во время фиксации были повреждены краевые области лоскута. Это могло произойти в результате избыточного давления нитью.

Фиксация с помощью клея демонстрировала как отличную адгезию, так и сохранение показателей эластичности ткани. Такой подход проще в использовании и требует меньшего времени. Проблема с цветом может быть объяснена наличием в составе клея БФ-6 эпоксидной смолы, которая в процессе полимеризации, контакта с воздухом и раневым содержимым приобретала темный оттенок. Когда пленки клея сходили естественным образом или удалялись, эта проблема исчезала самостоятельно.

Таким образом, оптимальная технология фиксации кожных лоскутов основана на применении клея БФ-6 в качестве фиксирующего агента. Этот способ фиксации был использован в серии экспериментов по аутооттрансплантации кожи крысам, консервированной разными способами.

2.5.3 Исследование скорости оседания Эр

Скорость оседания Эр (СОЭ) исследовали по методу Панченкова [26]. Принцип метода - смесь эритромазсы с цитратом Na при стоянии разделяется в аппарате Панченкова, состоящем из штатива и капиллярных пипеток со шкалой 100 мм, на 2 слоя (нижний – Эр, верхний – супернатант).

2.5.4 Исследование клоногенной активности культивируемых клеток

Определялась в группах, в которых клетки замораживали в суспензии. После определения доли жизнеспособных клеток, с каждого образца на полной ростовой среде высевали по 3 чашки Петри 35 мм в низкой посевной концентрации: $2 \cdot 10^3$ кл. /мл. Таким образом, каждая группа состояла из 21 чашки. Культуры инкубировали в течение 2 недель при 37°C и 5% CO₂. С помощью микроскопии производили подсчет колоний в каждой чашке, исключая колонии, содержащие менее 50 клеток. Клоногенную активность считали по формуле

$N_2/N_1 * 100 = \text{ЭК}$ и выражали в процентах, где ЭК – эффективность клонирования, N_2 – количество образованных колоний, N_1 – количество прикрепившихся клеток.

2.5.5 Исследование синтетической активности клеток по включению в ДНК 2^{14}C – тимидина

Производилась на жидкостном сцинтилляционном счетчике Бета-2. Определялась в группах, где клетки замораживали в суспензии.

Для этого клетки каждого образца помещали в культуральный флакон 25 см^2 в посевной концентрации $2,5 \cdot 10^5$ на флакон. Через сутки неприкрепленные клетки удаляли из культуры со сменой среды и добавляли меченный 2^{14}C -тимидин в концентрации 185 кБк/мл. среды. Культуры инкубировали в стандартных условиях в течение 3 суток. Затем клетки снимали с поверхности с помощью стандартной методики трипсинизации, трехкратно отмывали физиологическим раствором от среды, содержащей свободный 2^{14}C -тимидин. Осадок ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора. Из пробы брали 50 мкл клеточной суспензии для подсчета на камере Фукс-Розенталя, а в пробу добавляли 50 мкл 98% муравьиной кислоты. Содержимое пробирок перемешивали плавным покачиванием, и пробирки помещали на водяную баню $80\text{ }^\circ\text{C}$ на 60 минут. Подсчет осуществляли в одноразовых пластиковых флаконах, содержащих по 6 мл спирто-толуолового сцинтиллятора на счетчике Бета-2. Подсчет радиоактивности проб производили за 100 сек. в 4-х повторностях. Эффективность счета по ^{14}C – 98%. С целью определения фоновых значений также производили замеры фоновой светимости флаконов, содержащих только сцинтиллятор. Результаты выражали в Бк/ 10^5 клеток.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов вариационной статистики. В качестве средней величины во всех случаях вычисляли среднее арифметическое и среднеквадратичное отклонение. С каждой совокупностью вариант проводили тесты на нормальность распределения результатов. В случае нормального распределения использовали параметрические критерии. В остальных случаях вероятность ошибки (p) рассчитывали с использованием непараметрических критериев. Для каждой совокупностей вариант, соответствующих различным опытам и исследуемому биоматериалу использовали следующие критерии:

1) Суспензии эритроцитов

- Тест Шапиро-Вилкокса - для определения нормального или ненормального распределения данных в группах.
- Дисперсионный анализ (ANOVA)
 - параметрический (данные в группах с нормальным распределением) - только для среднего содержания гемоглобина в Эр
 - непараметрический (данные в группах с ненормальным распределением/ либо была использована ручная методика расчёта) - число эритроцитов, средний объем Эр, количество анизоцитов, СОЭ, показатели гемолиза, количество пойкилоцитов и дегмацитов. Межгрупповые сравнения - критерий Краскела - Уоллиса, тест Бонферрони-Данна
- При построении кривых осмотической стойкости вычисляли средние значения количества гемолизированных Эр для конкретных точек осмолярности среды. Вероятность ошибки в каждой точке рассчитывали с использованием непараметрического ANNOVA - теста.
- расчет точки 50%-ого лизиса Эр производили через построение квадратических или кубических функций. Достоверный результат получали при коэффициенте детерминации R^2 больше 0,9.

Для наглядности представления данных, на графиках исследованных показателей для опытных групп Эр строили пунктирные линии, обозначающие средние значения изучаемых характеристик для интактных – свежих (неконсервированных клеток) и негативного контроля – клеток, консервированных в отсутствии каких-либо ограждающих растворов или газов.

2) Кожные лоскуты

- Тест Шапиро-Вилкокса - для определения нормального или ненормального распределения данных в группах.
- Непараметрический дисперсионный анализ (ANOVA) так как была использована ручная методика расчёта. Межгрупповые сравнения - критерий Краскела - Уоллиса, тест Бонферрони-Данна.

3) Фибробластоподобные клетки первичной культуры (ФК)

- Тест Шапиро-Вилкокса - для определения нормального или ненормального распределения данных в группах.

- Непараметрический дисперсионный анализ (ANOVA) так как была использована ручная методика расчёта. Межгрупповые сравнения - критерий Краскела - Уоллиса, тест Бонферрони-Данна

Степень достоверности на всех графиках указывали, маркируя столбцы различным количеством звездочек. Минимальная степень достоверности составляла $p \leq 0,05$ – одна звездочка, максимальную степень достоверности изображали тремя звездочками на графике при $p \leq 0,001$. Квадратными скобками на графиках указывали достоверные межгрупповые различия, с прочими экспериментальными группами.

Обработка данных проводилась при помощи персонального компьютера IBM PC на базе операционной системы Windows 10 Professional. Первичные данные вводились с помощью табличного процессора Microsoft Excel 10. С целью расчета данных и построения графиков была использована программа GrapPad Prizm 6.0h. Статистически достоверными считали различие между сравниваемыми величинами при значении $p \leq 0,05$.

3. КОНСЕРВАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ КСЕНОНА И ЕГО КЛАТРАТОВ

Выбор эритроцитов (Эр) в качестве материала для исследования был обусловлен их качественно отличными свойствами упругости и эластичности [141]. Данное качество обусловлено наличием специальных белков цитоскелета - спектрина и актина, обеспечивающих стабильность Эр - способность противостоять значительной по величине деформации, например, турбулентному потоку крови. Поэтому достаточная стабильность обеспечивает циркуляцию Эр без фрагментации мембран. Эр так же имеют свойство деформабильности, проявляющееся при прохождении через микроциркуляторное русло, вследствие несоответствия диаметру капилляров. Описанные свойства Эр позволяют рассматривать их в качестве устойчивой модели деформационных повреждений, вызванных различными экстремами, например, гипербарического или клатратного воздействия Хе в условиях гипотермии.

Другой особенностью Эр является то, что основная часть энергии в виде АТФ и НАДН в этих клетках продуцируется в результате анаэробного гликолиза [89]. Поэтому создание гипербарической атмосферы ксенона или его клатратов в экспериментах с Эр, предполагающее исключение кислорода, для Эр не выглядит таким патогенным как для зрелых ядродержащих клеток, в которых основная часть макроэргов (АТФ, фосфагенов) генерируется за счет митохондриальных кислород-опосредованных механизмов и цикла Кребса.

И, наконец, практическая ценность разработки нового способа, обеспечивающего сохранность клеток, обусловлена тем, что на протяжении последних 100 лет для консервации изолированных эритроцитов используется раствор цитрата-глюкозы при $+4^{\circ}\text{C}$ (ЦФДА-1) со сроком хранения до 42 суток [144, 145], а новые консерванты, применяемые в рутинной практике, отсутствуют. Между тем, если принять во внимание, что основным механизмом повреждения Эр при их хранении в цитратном буфере считается свободно-радикальное окисление гемоглобина и липидов мембран [64, 73, 75, 122, 147], то вытеснение кислорода инертным газом, например, Хе, способно создать альтернативу известному методу.

3.1 Исследование морфофункциональных характеристик Эр

Исследуемые параметры количества, среднего объема, содержания гемоглобина, а также скорость оседания Эр представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Морфофункциональные показатели консервированных эритроцитов после 30-ти суточного хранения

Исследуемые группы	Измеряемые параметры			
	Количество Эр, $10^{12}/1 \text{ л}$	Средний объем Эр	Среднее содержание Hb в Эр	СОЭ (мм/ч)
ЦФДА-1 (контроль)	$5,27 \pm 0,19$	$85,48 \pm 2,124$	$31,39 \pm 0,431$	$1,37 \pm 0,397$
Интактные Эр	$5,83 \pm 0,302^*$	$85,18 \pm 0,109$	$30,62 \pm 0,148$	$1,92 \pm 0,130^*$
Гипербария Хе+ ЦФДА-1	$5,82 \pm 0,413^*$	$85,68 \pm 0,878$	$30,96 \pm 0,436$	$1,51 \pm 0,413$
Гипербария Хе	$5,26 \pm 0,808$	$91,26 \pm 2,037^*$	$30,99 \pm 0,378$	$0,82 \pm 0,171^*$
Клатраты Хе	$3,68 \pm 0,447^*$	$91,36 \pm 1,312^*$	$31,31 \pm 0,56$	$1,01 \pm 0,337$
Клатраты Хе+ЦФДА-1	$4,0 \pm 0,632^*$	$90,62 \pm 1,248^*$	$31,14 \pm 0,505$	$1,30 \pm 0,300$
Негативный контроль	$3,55 \pm 0,273^*$	$89,38 \pm 0,281^*$	$31,70 \pm 0,234$	$4,18 \pm 0,521^*$

*- достоверные различия с контролем (ЦФДА-1) при $p \leq 0,05$

Из таблицы следует, что количество Эр достоверно отличалось от контроля в большинстве исследуемых групп. В наибольшей степени количество Эр было повышено для группы с гипербарией Хе+ЦФДА-1 (5,82 и 5,27 в контроле), в которой абсолютное число клеток на 10,44 % превышало контроль и достоверно не отличалось от группы неконсервированных Эр (5,82 и 5,83). Для остальных экспериментальных групп, в которых был использован Хе в качестве консерванта, отмечалось снижение количества функционирующих Эр, особенно для групп с клатратами Хе и клатратами Хе+ЦФДА-1 на 30,17 % и 24,10 % соответственно. Единственной группой, которая демонстрировала отсутствие достоверных различий с контролем, была группа с гипербарией Хе (5,26 и 5,27).

Значения показателя среднего объема Эр достоверно отличались от группы ЦФДА-1 в группах негативного контроля, гипербарии Хе, клатраты Хе и клатраты Хе+ЦФДА-1 ($p \leq 0,05$). Исследуемый параметр был повышен в группах гипербарии Хе и негативный контроль на 5,78 (6,76%), 3,9 (4,56%) соответственно. В образцах интактных Эр и гипербарии+ЦФДА-1 не

наблюдается статистически значимых отличий от ЦФДА-1. В группах с клатратами Хе и клатратами Хе+ЦФДА-1, показатель среднего объема сопоставим с гипербарией Хе и повышен на 5,88 (6,88%) и 5,14 (6,01%) в сравнении с ЦФДА-1 соответственно.

Характеристика среднего содержания Нв в Эр не выявила статистически значимых различий с контролем.

Повышение СОЭ в 3,05 раза по сравнению с контролем было зафиксировано в группе негативного контроля (4,18 и 1,37, $p \leq 0,05$). В группах интактных Эр и с гипербарией+ЦФДА-1 показатель был повышен на 0,55 мм/ч (в 1,4 раза) и 0,14 мм/ч (1,1 раза) соответственно. Снижение параметра в сравнении с ЦФДА-1 было зафиксировано для групп с гипербарией Хе, клатратами Хе и клатратами Хе+ЦФДА-1 на 0,55 (1,67 раза), 0,36 (1,35 раза) и 0,07 (1,05 раза) соответственно.

С помощью критериев Краскела-Уоллиса и Бонферрони-Данна были произведены сравнения исследуемых параметров между всеми группами. Достоверные межгрупповые различия были зафиксированы для показателей среднего объема Эр и СОЭ (рисунок 15).

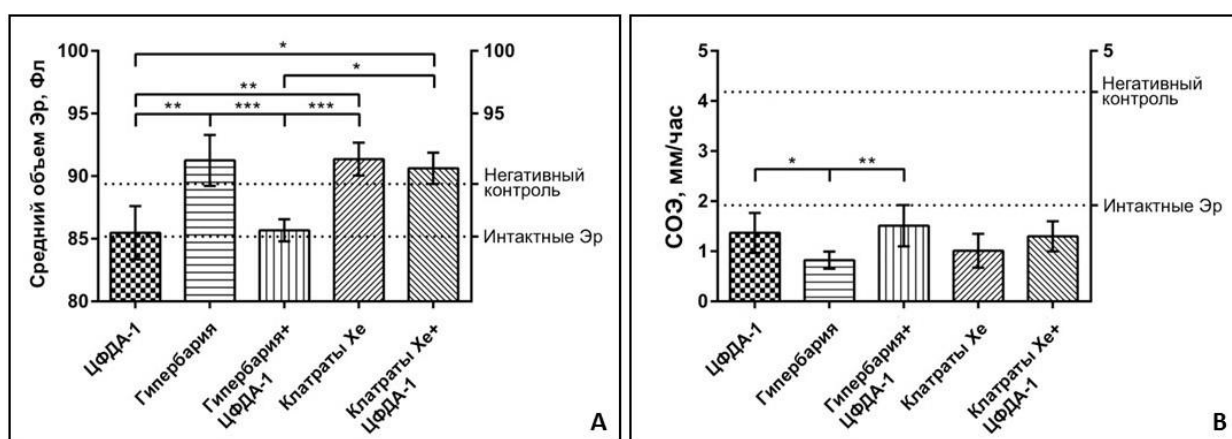


Рисунок 15 – межгрупповое сравнение с помощью критерия Краскела-Уоллиса. А-параметры среднего объема Эр. В – параметр СОЭ. Здесь и далее квадратными скобками указаны достоверные различия между исследуемыми группами (межгрупповой анализ). Количество звездочек указывает на степень достоверности различий. Минимальная степень достоверности составляла $p \leq 0,05$ – одна звездочка, максимальная при $p \leq 0,001$ – три звездочки.

В показателе среднего объема Эр после консервации прослеживаются определенные закономерности, связанные, возможно, с кессонными повреждениями, развивающимися во время дегазации образцов. Возможно ксенон, растворенный в мембранах эритроцитов на этапе консервации, не способен быстро покидать их во время расконсервации по причине повышенной тропности к липидам при положительном давлении. Это подтверждается отсутствием достоверных различий показателя среднего объема Эр между группами, в которых

было использовано избыточное давление ксенона, за исключением группы с гипербарией Хе+ЦФДА-1, в которой не наблюдается увеличения объема Эр по сравнению с контролем (Рисунок 15А). По-видимому, раствор ЦФДА-1 играет роль блокатора для растворения ксенона в мембранах, за счет мембранопротективных свойств. В то же время в Эр, консервированных без каких-либо консервантов, могло произойти изоосмотическое набухание, вызванное продолжительным пребыванием в остаточных количествах буферного раствора во время хранения. Этот механизм, вероятно, связан с избыточным внутриклеточным давлением Эр за счет содержащегося в них гемоглобина. В условиях неизменных значений клеточной и плазматических фракций крови *in vivo* это давление уравнивается за счет присутствующих альбуминов и электролитов, создающих онкотическое и осмотическое давление плазмы. Однако после удаления супернатанта плазмы для исследуемых групп были удалены и альбумины, за счет чего мог быть реализован процесс изоосмотического набухания, характерного для Эр, помещенных в растворы физиологической осмолярности. Тем самым, имеющегося количества плазмы, по-видимому, достаточно для изоосмотического сфероцитоза, но недостаточно для образования пойкилоцитов в интактной группе (таблица 10). Вышеперечисленное обуславливает разнообразие механизмов, лежащих в основе увеличения среднего объема Эр в исследуемых группах, так как условия их начальной гидратации и время хранения были сопоставимы.

В полученных значениях среднего содержания Hb в Эр не наблюдается физиологически, и статистически значимых различий. Анализируя значения данного показателя для разных групп, становится ясно, что образцы, консервированные в гипербарии Хе+ЦФДА-1, демонстрируют выраженный консервирующий эффект, сопоставимый с интактными Эр, которые были исследованы немедленно после венепункции. В остальных случаях использования Хе было показано меньшее консервирующее действие, однако образцы, в которых была использована изолированная гипербария Хе, демонстрировали эффект, сопоставимый с контрольной группой. Также, по количеству сохранных Эр после расконсервации, гипербария Хе демонстрирует лучший консервирующий эффект чем клатраты Хе. Возможным механизмом, лежащим в основе таких различий, может быть избыточное давление, которое в группе с клатратами Хе было намного выше, чем в группе с гипербарией Хе.

Анализ СОЭ показал, что только в негативном контроле прослеживается тенденция к увеличению скорости оседания Эр, в то время как в остальных опытных группах данный показатель демонстрирует замедление. С одной стороны, данный феномен может быть связан с использованием фосфатного буфера без Ca^{2+} и Mg^{2+} в качестве отмывочного и окончательного взвешивающего раствора во всех исследуемых группах. Известно, что белки, присутствующие

в плазме, увеличивают СОЭ за счет агрегации на поверхности мембран и увеличения заряда последних, поэтому при замещении плазмы на безбелковый изоосмотический раствор снижение СОЭ происходит за счет блокирования опсонинового механизма, увеличивающего силы притяжения между отдельными Эр. Таким образом, замедляется наступление второй – самой быстрой фазы СОЭ – образования монетных столбиков (конгломерации эритроцитов). Наряду с этим, зафиксированная меньшая СОЭ для всех ЦФДА-1- содержащих групп может быть связана с мембраностабилизирующим эффектом компонентов раствора.

Приведенные показатели Эр продемонстрировали преимущества использования гипербарии Хе в качестве консерванта, особенно при сочетании со стандартным консервирующим раствором ЦФДА-1, в отличие от стандартного способа хранения в ЦФДА-1. Вместе с тем, возможность появления патологических форм Эр, снижающих, транспортную и газообменную функцию Эр, обуславливает необходимость морфологического исследования мембран Эр с целью установления механизмов, обеспечивающих подобные трансформации.

3.2 Исследование сохранности мембран эритроцитов и определение их осмотической резистентности

С целью оценки изменения мембран Эр оценивали количество пойкилоцитов, дегмацитов и анизоцитов. Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Гистологическая характеристика консервированных эритроцитов после 30 – ти суточного хранения

Исследуемые группы	Измеряемые параметры			
	Пойкилоциты, %	Дегмациты, %	Анизоциты, %	Гемолиз, %
ЦФДА-1 (контроль)	3,21±1,048	1.02±0,311	15,75±4,625	15,68±1,695
Интактные Эр	0,12±0,109*	0±0*	12,84±0,255*	0±0*
Гипербария Хе+ ЦФДА-1	1,41±0,594*	0,16±0,159*	13,46±0,342	2,76±1,907*
Гипербария Хе	1,31±0,384*	1,67±0,653*	17,95±1,138*	17,81±4,206
Клатраты Хе	1,62±0,595*	3,16±0,441*	25,12±4,219*	29,65±1,631*
Клатраты Хе+ЦФДА-1	1,63±0,3*	1,73±0,935*	17,68±1,578*	24,35±2,873*
Негативный контроль	0,47±0,304*	3,89±1,208*	21,10±1,104*	30,22±2,066*

*- достоверные различия с контролем (ЦФДА-1) при $p \leq 0,05$

Во всех группах отмечается пониженное количество пойкилоцитов в сравнении с ЦФДА-1. Самые низкие значения параметра зафиксированы в группах негативного контроля и свежих Эр и составляют 0,47% и 0,12% ($p \leq 0,05$), что ниже на 85,35% и 96,26% соответственно содержания пойкилоцитов в контроле. Для групп с гипербарией Хе, гипербарией Хе+ЦФДА-1, клатратов Хе и клатратов Хе+ЦФДА-1 исследуемая характеристика была снижена по отношению к группе ЦФДА-1 на 59,19%, 56,07%, 49,53% и 49,22% соответственно ($p \leq 0,05$). Межгрупповой анализ, с использованием критерия Краскела-Уоллеса не выявил достоверных различий в полученных результатах между группами, где был использован Хе.

Количество дегмацитов в группах с гипербарией Хе и клатратами Хе+ЦФДА-1 было выше в сравнении с ЦФДА-1 на 0,65 % (в 1,64 раза) и на 0,71 % (в 1,7 раза), соответственно. Существенное увеличение количества дегмацитов было получено в группах негативного контроля и клатратов Хе на 2,87% (в 3,81 раза) и на 2,14% (в 3,1 раза) относительно контроля соответственно. Наименьшее количество дегмацитов было зафиксировано в группе с гипербарией+ЦФДА-1, в которой количество дегмацитов уменьшилось в 6,38 раза и, согласно критерия Краскела-Уоллиса достоверно отличалось от всех опытных групп, кроме группы контроля. Межгрупповой анализ представлен на рисунке 16.

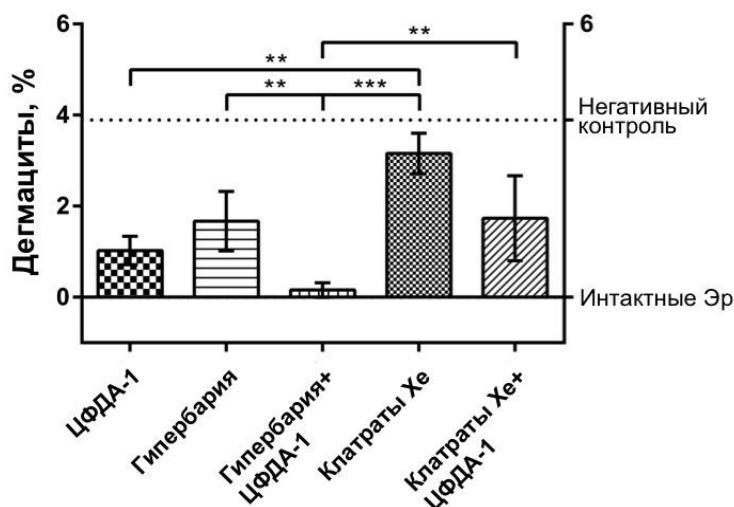


Рисунок 16 - Межгрупповой анализ количества дегмацитов по тесту Краскела-Уоллиса

Существенные различия наблюдаются так же в степени выраженности анизоцитоза. Значения исследуемого показателя были повышены в сравнении с ЦФДА-1 на 9,37 % (на 59,49 %) и 5,35 % (на 33,97 %) для группы клатраты Хе и негативного контроля соответственно. Меньшая гетерогенность Эр в сравнении с контролем наблюдалась в группах с гипербарией Хе - 2,2 % (на 13,97 %) и клатратов Хе+ЦФДА-1 - 1,93 % (на 12,25%). В группе с гипербарией+ЦФДА-1 наблюдается меньший процент анизоцитов в сравнении с ЦФДА-1 на

2,29 % (на 14,54%). Согласно критерия Краскела-Уоллиса межгрупповой анализ выявил наличие существенных различий для группы гипербария Хе + ЦФДА-1 со всеми опытными группами за исключением контроля, что представлено на рисунке 17.

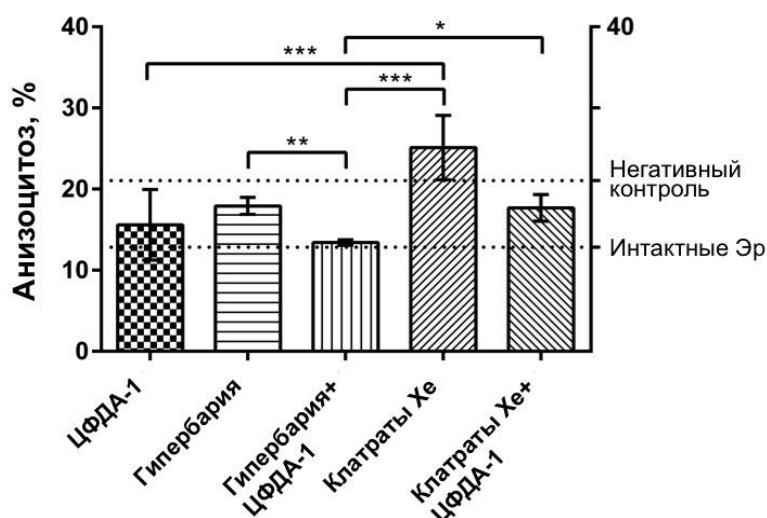


Рисунок 17 - Межгрупповой анализ количества анизоцитов по тесту Краскела-Уоллиса

Гемолиз Эр в сравнении с ЦФДА-1 был наиболее значительным в группах негативного контроля (30,22% и 15,68% в контроле, $p \leq 0,05$), клатратов Хе (29,65% $p \leq 0,05$) и клатратов Хе + ЦФДА-1 (24,35% $p \leq 0,05$) в 1,93, в 1,89 и 1,55 раза соответственно. В группе гипербарии Хе процент разрушенных клеток в 1,14 раза превышал контроль (17,81 %). Наименьший гемолиз был зафиксирован в группе с гипербарией Хе+ЦФДА-1 (2,76 % $p \leq 0,05$), что в 5,68 раза ниже группы сравнения – ЦФДА-1. Межгрупповой анализ, выявивший достоверные различия в большинстве групп, представлен на рисунке 18.

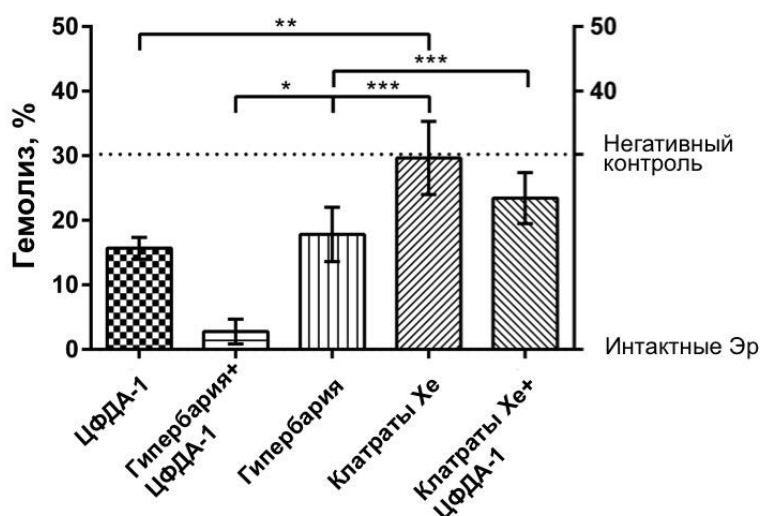


Рисунок 18 - Межгрупповой анализ степени гемолиза Эр по тесту Краскела-Уоллиса

Одной из важных характеристик Эр является количество пойкилоцитов – клеток с зубчатой мембраной. В проведенных исследованиях с использованием метода атомно-силовой микроскопии была показана динамика образования «шипов и наростов» на мембранах эритроцитов с увеличением срока хранения в консервирующем растворе. При этом начало процесса ассоциировалось с образованием мелких пор, которые сливаясь вместе, образуют более крупные деформации мембран [61, 124]. Процесс трансформации дискоцита в пойкилоциты может происходить через образование промежуточных форм эритроцитов, в частности сфероцитов. В результате пребывания клеток в изоосмотической среде они пропускают через мембрану избыточное количество воды, уравнивающее внутриклеточную гиперосмию. Такие Эр отличаются морфометрически и не способны пройти спленальный контроль, что приводит к их постепенной утилизации.

Из полученных результатов следует, что наибольшее количество таких клеток наблюдалось в группе с ЦФДА-1 (таблица 10, рисунок 19С) в то время как в группе негативного контроля наблюдалось минимальное значение этого показателя, что противоречит данным микроскопии выявившей дегмациты в большем количестве, чем пойкилоциты (рисунок 1В). Дегмациты, представляющие собой стромальные элементы разрушенных Эр («надкусанные» мембраны), образуются на организменном уровне по причине недостатка Г-6-ФД, который необходим для перехода, окисленного глутатиона в восстановленную форму, инактивирующую активные формы кислорода. Примечательно, что во всех группах количество дегмацитов практически прямо пропорционально степени гемолиза (таблица 10).

Означенное дает возможность предположить, что основными механизмами, лежащими в основе повреждения Эр во время хранения, являются окисление гемоглобина и липидов мембран Эр с участием свободных радикалов, а также прямое разрушающее воздействие дегазации клатратов на мембраны клеток, посредством их перерастяжения и разрушения. При этом количество дегмацитов может отражать «готовность» суспензии к лизису, а также являться заключительным звеном в цепочке превращений дискоцит-сфероцит-пойкилоцит, в то время как промежуточные звенья этой цепи могут носить обратимый характер.

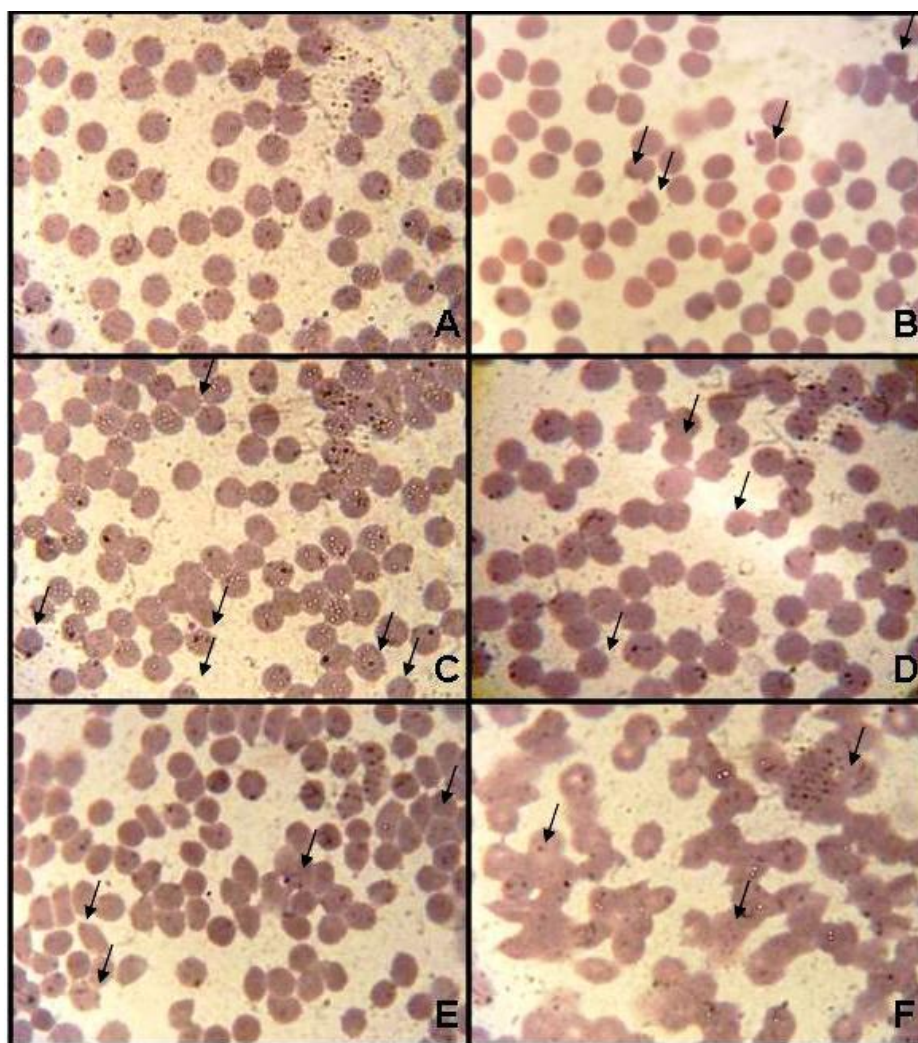


Рисунок 19 - Эритроциты, консервированные различными способами. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение в 400 раз. А- интактные Эр. В – Негативный контроль (стрелками указаны дегмациты). С – консервация в ЦФДА (стрелками указаны пойкилоциты). D – Консервация в гипербария+ЦФДА (стрелками указаны гетерогенные по размеру эритроциты). Е – Консервация в клатратах Хе+ЦФДА (стрелками указаны агрегаты клеток). F – Консервация в клатратах Хе (стрелками указаны сладж-эритроциты)

В группах исследования гипербарии Хе уже при приготовлении мазков отмечалась повышенная склонность к деформации, потере эластичности и образованию агрегатов Эр (Рисунок 19Е). Описанный эффект наблюдался в группах с клатратами Хе. При этом Эр, консервированные в клатратах, проявляли склонность к сладжированию (Рисунок 19F). В то время как в группе гипербарии Хе и ЦФДА-1 наблюдались лишь явления гетерогенности Эр по объему, но отсутствовали явления агрегации, а количество дегмацитов было минимальным во всех исследуемых препаратах (Рисунок 19D). Разница в оцениваемых показателях между группами гипербарии Хе и гипербарии Хе+ЦФДА-1 может быть обусловлена наличием мембраностабилизирующего и трофического действия раствора ЦФДА-1, который проявляет

максимальный эффект в сочетании с ксеноном, за счет блокирования окислительных механизмов. Последнее возможно благодаря использованию избыточного давления инертного газа. С другой стороны, давление может играть негативную роль, так как известное сродство ксенона к липидам биологических мембран означает повышение его растворимости в них, особенно при использовании повышенных давлений. В свою очередь, давление Хе, требуемое для образования клатратов клеточных суспензий выше, чем при просто гипербарических условиях, поэтому и ксенон в данных условиях будет растворяться в липидах мембран в больших количествах. Последнее будет означать как чрезмерное количество растворенного газа, которое не в состоянии покинуть мембраны Эр, не повредив их на этапе дегазации, так и чисто механическое воздействие клатратов на мембраны клеток. При этом известно, что механическое воздействие на мембрану Эр приводит к активации протеинкиназы С и инозитолового цикла, результатом которых является повышение эластических свойств Эр, которые могут обуславливать повышенную склонность к агрегации всей суспензии клеток [48]. Доказательством этому могут быть рисунки 19Е и 19F, на которых заметна динамика от агрегации до сладжа, в группах с клатратами Хе+ЦФДА-1 и просто клатратами Хе. В свою очередь, повышенное давление, используемое в образцах с гипербарией Хе, недостаточно высокое для растворения больших количеств Хе в мембранах клеток. Вместе с тем, увеличение среднего размера Эр в группе с изолированной гипербарией Хе, предполагает растворение Хе в мембранах Эр и последующее их расширение за счет механизмов дегазации. В то же время в группе сочетанного воздействия гипербарии Хе и ЦФДА-1 наблюдается синергетическое действие ЦФДА-1 и Хе, как в сравнении с изолированным ЦФДА-1, так и в сравнении со свежими Эр. Об этом свидетельствует отсутствие достоверных различий в показателях среднего объема и параметрах анизоцитоза, определяющих гетерогенность суспензии в данных группах (таблица 10, рисунок 19А, 19С, 19D).

Важнейшим показателем эффективности различных способов консервации является оценка гемолиза. Образцы, в которых использовалась изолированная гипербария Хе, показали результаты, сопоставимые с эталонным гемоконсервантом ЦФДА-1, а максимальный эффект был зарегистрирован при сочетанном применении гипербарии Хе и ЦФДА-1. В экспериментах с образцами, консервированными в гипербарии Хе, можно предположить ведущую роль протективного механизма, вызванного вытеснением молекул кислорода и, как следствие, минимизацией или полным отсутствием свободнорадикального окисления [74, 75, 166]. Наряду с этим, ввиду равновесного замещения азота и кислорода в консервируемой суспензии на инертный газ, может быть блокирован механизм окисления гемоглобина, который играет важную роль в инициации каскада реакций, разрушающих эритроциты [111]. По всей видимости, как эффект раствора ЦФДА-1 опосредован через минимизацию окислительного

стресса посредством мембранопротекторов и биоантиоксидантов, так и избыточное давление ксенона способно консервировать Эр путем равновесной экстракции Хе кислорода вследствие исключения последнего в качестве донора свободных радикалов [36]. Вместе с тем, значительный эффект сочетанного использования гипербарии Хе и ЦФДА-1 может быть реализован за счет синергетического действия трех компонентов, когда ЦФДА-1 служит в качестве мембранопротектора и депо питательных веществ, а Хе препятствует окислению. Эти данные согласуются с результатами исследований негативного контроля, который с течением времени демонстрировал значительное прогрессирование гемолиза, достигая максимума к 30 суткам хранения.

В группах, в которых были использованы клатраты Хе в качестве консервирующего агента, наблюдался наибольший гемолиз. Данный феномен может быть связан, как минимум с тремя факторами: разрушение мембран клеток во время образования клатратов, декомпрессионные повреждения в момент разогрева, обусловленные резким снижением растворимости газа, а также разрушающее действие самих клатратов на суспензию клеток с течением времени. Последнее может быть связано с аккумуляцией Хе молекул свободной воды, которые необходимы для построения клатратных решеток. Таким образом, во время консервации в клатратах Хе вода выходит из клеток сходным образом, как если бы это происходило при помещении клеток в гипертонический раствор. Клетка уменьшается в объеме и внутриклеточное содержимое становится гиперконцентрированным, что уже само по себе может повреждать клетку и препятствовать нормальному метаболизму даже в условиях его замедления. Так же на этапе расконсервации в клетки устремляется деклатрированная вода уравнивающая гиперосмотическое содержимое внутри клеток. При этом Эр уже могли быть терминально повреждены на этапе клатрирования вследствие образования локальных участков перерастяжения мембран во время дегидратации и последующего уменьшения размеров. Подтверждением последнего механизма может служить тот факт, что в группе изолированных клатратов Хе наблюдается максимальная степень анизоцитоза. В других группах прослеживается прямая и близкая к линейной зависимость параметров анизоцитоза и гемолиза, особенно там, где показатель анизоцитоза выходил за пределы физиологической нормы.

Повышенная деформабильность мембран, тенденция к склеиванию Эр, показатели анизоцитоза и гемолиза, особенно в группах с клатратами, побудили нас к проверке кривых осмотической резистентности Эр (рисунки 20, 21). Известно, что исследование данного показателя имеет большую ценность для прогнозирования поведения Эр в кровеносном русле, так как они постоянно подвергаются деформационному воздействию при прохождении через

кровеносные капилляры, диаметр которых меньше размера Эр. Последнее обстоятельство обуславливает высокую эластичность мембран Эр.

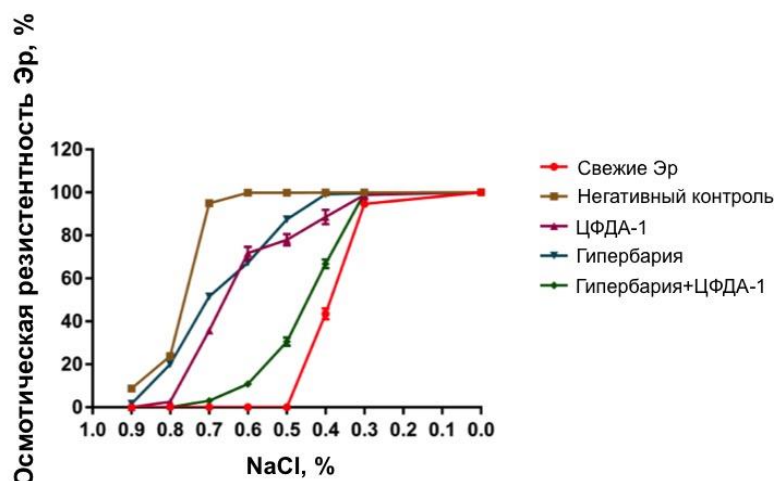


Рисунок 20 - Кривые осмотической резистентности для групп гипербарии Хе, свежих Эр и негативного контроля

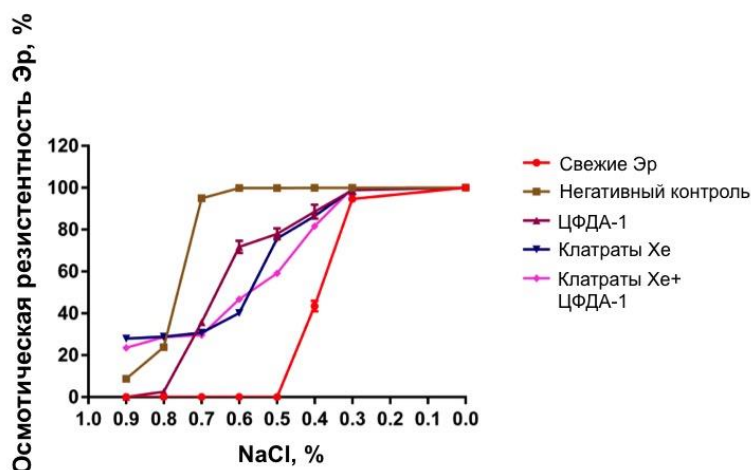


Рисунок 21 - Кривые осмотической резистентности для групп клатратов Хе, свежих Эр и негативного контроля

Из графиков следует, что кривая резистентности для группы с гипербарией Хе+ЦФДА-1 демонстрирует сходные с интактными Эр показатели устойчивости к осмотическим изменениям. В свою очередь образцы, в которых в качестве консервирующего агента использовалась изолированная гипербария Хе, демонстрировали сходство с контрольной группой. В группах с клатратами Хе обращает на себя внимание то, что клатраты+ЦФДА-1 демонстрировали более равномерное снижение показателя осмотической резистентности для всей суспензии по сравнению с группой изолированных клатратов Хе. Для данных групп было так же отмечено, что начальный показатель стойкости суспензии был самым низким среди других исследуемых групп, включая негативный контроль. Однако, с понижением

осмолярности среды в группах клатратов меньшее количество Эр было подвержено лизису, в результате перерастяжения мембран гипотоническим раствором. Из графиков следует, что в группах с клатратами Хе и клатратами Хе+ЦФДА-1 меньшее количество Эр было разрушено в одинаковых точках осмолярности среды, даже в сравнении с контролем.

Известно, что площадь нормальных Эр, как минимум в 1,8 раз больше чем их объем. Интактные Эр имеют форму двояковогнутого диска и при гипотонии дискоцит может приобретать форму сфероцита, при этом его площадь не изменится, а объем увеличится. Однако клеточные мембраны являясь достаточно ригидными структурами, плохо поддаются растяжению, поэтому достигнув определенного уровня гидратации, Эр разрушается. Важно понимать, что значение осмотической стойкости для разных Эр в суспензии различается, так как в суспензии всегда присутствуют Эр, отличающиеся по возрасту и другим параметрам. В идеальном случае для каждого Эр может быть подобрана своя величина осмолярности, при которой он будет сохранять целостность мембраны. Однако известно, что гетерогенность характеристик Эр в суспензии подчиняется нормальному закону Гаусса и в конечном итоге распределение Эр в любой точке и объеме суспензии будет одинаковым [32]. Поэтому одним из способов оценки ригидности/эластичности мембран Эр может быть регистрация показателя средней осмотической хрупкости [22]. Данный параметр рассчитывается из данных осмотической резистентности как величина осмолярности NaCl, при которой гемолизируется 50 % Эр в исследуемой суспензии. Расчетный показатель представлен на рисунке 22. Для удобства информация представлена в виде ряда, начинающегося от самой устойчивой к осмотическому воздействию группы Эр и заканчивающегося самой лабильной группой.

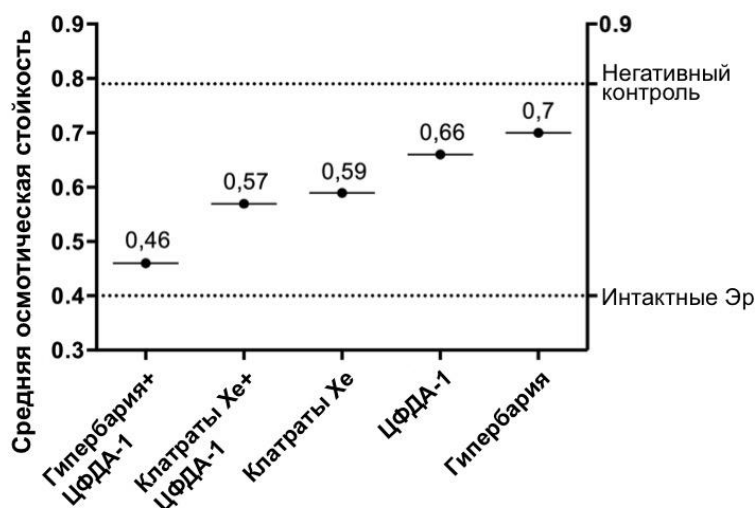


Рисунок 22 - Расчетный показатель - средняя осмотическая хрупкость Эр после 30-ти суточной консервации разными способами. Расчет произведен при коэффициенте детерминации $R^2 > 0,9$, обуславливающим сильную функциональную зависимость данных – достоверность значений.

Из полученных данных следует малозначимость различий между группами ЦФДА-1 и гипербарии Хе, в которых наблюдалась наибольшая гибель Эр при показателях осмолярности среды равных 0,66 и 0,7% соответственно. В свою очередь, группы клатратов Хе и клатратов Хе+ЦФДА-1 демонстрировали большую сохранность стабильности мембран. Средняя осмотическая хрупкость для данных групп регистрировалась при показателе осмолярности раствора NaCl 0,57 и 0,59 %. В группе гипербарии Хе+ЦФДА-1 сохранность Эр оказалась наивысшей и на 30,3% превысила таковую в контрольной группе. При этом показатель осмотической хрупкости был сопоставим с интактными Эр (0,46 и 0,4 соответственно).

Снижение осмотической резистентности наблюдается в большинстве групп, за исключением интактных Эр. По-видимому, ведущим механизмом повреждения в данном случае является осмотическое набухание Эр во время хранения в изоосмотической среде. Такой механизм был описан ранее и применялся для объяснения увеличения среднего объема клеток. Увеличенные до размеров сфер Эр разрушаются при проникновении в них даже малых количеств воды. На графиках прослеживается прямая связь между показателями снижения осмотической резистентности и увеличением объема Эр. Описанные закономерности характерны для большинства исследуемых групп, кроме ЦФДА-1, в которой набухание Эр с течением времени практически не наблюдалось (таблица 9). Механизмом, объясняющим столь высокое значение осмотической хрупкости, может быть постепенное разрушение мембран и образование в них пор за счет перекисного окисления липидов и образования супероксидного анион-радикала в результате окисления гемоглобина, присутствующим в суспензии молекулярным кислородом [97, 124, 131].

Низкие значения показателя хрупкости, зафиксированные для групп клатратов Хе, могут быть связаны с повышенной адаптацией Эр к экстремальным факторам в процессе клатрирования и деклатрирования. Так как с одной стороны, только эти группы демонстрировали наибольшие начальные разрушения клеток, которые достигали 30 % значений даже во время взвешивания в изотоническом растворе (рисунок 21). Поэтому слабые и поврежденные Эр могли быть незамедлительно разрушены даже изотоническим раствором ввиду малой жизнеспособности, в то время как оставшиеся проявляли большую стойкость. С другой стороны, податливость и эластичность клатрированных Эр, наблюдаемая при приготовлении мазков, так же объясняет повышенную осмотическую стойкость в этих группах, а ее механизм может быть связан с повышением деформабильности Эр во время действия повышенных давлений и клатратообразования.

3.3 Электронная микроскопия эритроцитов и оценка повреждений на разных сроках

Известно, что в зрелых Эр основная генерация молекул АТФ происходит в результате анаэробного гликолиза по пути Эмбдена-Мейергофа. В связи с этим Эр являются уникальными форменными элементами, сохраняющими способность к поддержке основного клеточного обмена в отсутствии кислорода. Механизмы протективного действия гипербарии Хе находят объяснение в замещении кислорода. Однако неясными остаются механизмы повреждения Эр при консервации в клатратах Хе. С одной стороны, мы наблюдаем гемолитическое действие клатратов на суспензию Эр, с другой – остается неясным в какой конкретный момент консервации эти повреждения развиваются. Вместе с тем факт повышенных декомпрессионных повреждений имел место быть во всех случаях, в которых были использованы клатраты ксенона. Это выразалось вспениванием консервируемой суспензии на этапе расконсервации клатратов (деклатрация, дегазация) наблюдаемое на рисунке 23.



Рисунок 23 - Вспенивание суспензии Эр на этапе деконсервации

Данный механизм повреждения может быть охарактеризован как кессонный эффект вследствие выраженной дегазации так как в клатрируемых суспензиях растворяется значительно больше Хе чем при гипербарии. Согласно супрамолекулярной теории образования клатратов – в одном объеме воды может быть заключено до 180 объемов газа [13]. С другой стороны, растворенному ксенону требуется плавная экстракция, а повреждения вследствие декомпрессии может быть уменьшено использованием промывочного газа, при избыточном давлении последнего. Наряду с этим, тщательный подбор газа и протокола деконсервации могут свести к минимуму повреждающее действие декомпрессии. Однако для проверки данной гипотезы следует убедиться, что именно декомпрессионный механизм является ведущим повреждающим фактором, воздействующим на Эр, консервируемые в клатратах Хе.

Условно любую консервацию биообъекта можно разделить на три этапа. Первый - это непосредственно консервация, когда мы воздействуем консервирующим агентом на биообъект и подвергаем его дополнительному воздействию, в основном гипотермическому. Второй – это хранение в гипотермических условиях. Третий – расконсервация, во время которой происходит повышение температуры до комнатной или физиологической и отмывание от консервирующего фактора с дегазацией. Вместе с тем дегазация повреждает консервируемый объект и зависит от ряда параметров, изменяя которые можно уменьшить или свести к минимуму ее повреждающее действие. Тем самым остается установить наличие и характер повреждений, развивающихся при консервации и хранении. Так как с одной стороны, если во время первых двух этапов повреждения не будут фиксироваться, возможно, что Эр в клатратах можно хранить очень долго. С другой стороны, будут получены данные о механизме дегазации как основном повреждающем агенте или наличии других патогенов, которые могут параллельно развиваться и приводить к дополнительным повреждениям.

С целью изучения повреждающего действия клатратов Хе на Эр в фазе консервации была проведена сканирующая электронная микроскопия (рисунок 24).

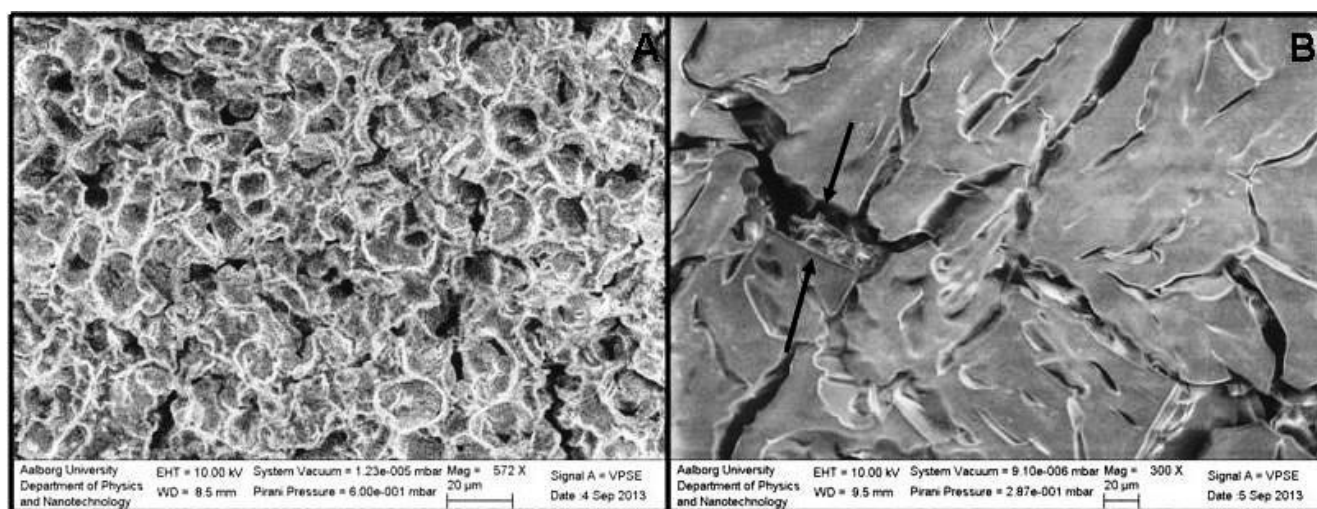


Рисунок 24 - Сканирующая электронная криомикроскопия консервированных Эр. Увеличение в 500 раз. А – Эр, консервированные в клатратах Хе. В – Эр, консервированные в отсутствии консервирующего агента (негативный контроль)

В качестве группы сравнения были выбраны образцы Эр, консервированные в отсутствии консервантов и ограждающих растворов, так как целью исследования было визуализировать повреждения, развивающиеся во время консервации в клатратах. Для этого, с одной стороны, следовало установить характер повреждений, развивающихся в Эр при консервации для негативного контроля. С другой стороны, мы не могли использовать в качестве контроля образцы с ЦФДА-1, так как СЭМ предусматривает исследование объектов, находящихся в твердом агрегатном состоянии, которыми являются клатраты, но не суспензия

ЦФДА-1. В свою очередь, использование стандартной техники криоконсервации Эр в растворе глицерина было нецелесообразным как по причине неспособности этого раствора образовывать твердое агрегатное состояние при положительных температурах, так и по причине непопулярности способа в рутинной практике хранения крови и ее компонентов. В нашем случае использование негативного контроля представляло большую ценность для группы сравнения, особенно когда необходимо сравнивать исследуемый способ по величине возникших повреждений с заведомо тотально поврежденным образцом. Так как важной особенностью способа клатратной консервации является достижение консервирующего эффекта клеток за счет способности иммобилизовать воду в биообъекте, и переводить последнюю в твердое агрегатное состояние уже при положительных температурах (0-+4 °C).

Из полученных снимков следует, что клатраты Хе демонстрируют значительные различия в морфологии консервируемой суспензии в сравнении с контролем. На клатратном снимке видны отдельно различимые Эр, хотя плотность консервируемой суспензии была очень большой. По-видимому, это может быть причиной некоторой деформации и склеенности клеток друг с другом. Противоположную и в тоже время ожидаемую картину можно наблюдать в группе негативного контроля, которая демонстрирует тотальный гемолиз и тенденцию к образованию кристаллов раствора гемоглобина.

Таким образом, на всех снимках клатрированных Эр мы не наблюдали значительных признаков разрушения клеточной суспензии, особенно в сравнении с негативным контролем. Это может быть свидетельством минимизации повреждений, развивающихся во время первого этапа консервации-клатрирования клеточной суспензии.

Невыясненным остается вопрос наличия или отсутствия повреждающего действия клатратов во время хранения. Для исследования поставленной задачи была проведена оценка гемолитического эффекта различных консервантов с течением времени, на 5 и 15 сутки (таблица 11). Результаты на 30 сутки хранения были взяты из таблицы 11.

Таблица 11 - Гемолиз Эр, расконсервированных на разных сроках хранения при +4 °C

В процентах

Время хранения, сутки Группа	5	15	30
ЦФДА-1	0,897±0,581	6,886±1,584	15,686±1,695
Гипербария Хе+ЦФДА-1	0,003±0,001*	1,241±0,858*	2,765±1,907*
Гипербария Хе	0,125±0,074*	5,773±2,034	17,811±4,206
Клатраты Хе+ЦФДА-1	5,354±2,071*	12,473±2,379*	24,35±2,873*

Клатраты Хе	7,758±1,176*	11,282±1,564*	29,65±1,631*
Негативный контроль	1,431±0,236*	19,231±1,976*	30,221±2,066*

*- достоверные различия с контролем (ЦФДА-1) при $p \leq 0,05$

Из таблицы следует, что все группы демонстрируют динамику увеличения показателя гемолиза с течением времени, однако характер этих изменений различен. Например, в группах гипербарии Хе+ЦФДА-1, клатраты Хе+ЦФДА-1 и ЦФДА-1 наблюдается практически линейная динамика гемолиза с течением времени. В то же время группы изолированного воздействия ксенона: гипербария и клатраты демонстрируют меньшее значение гемолиза на 15 сутки и ускоренную динамику лизиса в периоде 15-30 сутки хранения. Необходимо отметить, что в большинстве случаев получены достоверные различия, за исключением групп с гипербарией Хе и ЦФДА-1, что потенциально позволяет рассматривать гипербария Хе как замену стандартному ЦФДА-1.

Полученные значения свидетельствуют о том, что в группах с клатратами Хе и клатратами+ЦФДА-1 имеется динамика нарастания показателя гемолиза с течением времени. Причем если для группы клатраты+ЦФДА-1 повреждения увеличиваются равномерно с течением времени, то для изолированных клатратов Хе характерно неравномерное развитие повреждений. В последнем случае пик гемолиза фиксировался на 30 сутки, тогда как на 15 сутки это значение было непропорционально низким. Динамично развивающийся гемолиз Эр в группах клатратов может свидетельствовать о реализации механизма повреждения, опосредованного постепенностью образования клатратов. Так, при повышенном давлении и инициации начального клатрирования суспензии, вся часть свободной воды не связывается в клатраты одномоментно, а происходит постоянное увеличение числа клатратов в суспензии. Неравномерность клатрирования приводит к тому, что с течением времени уже образованные клатраты, превращают околоклеточное пространство в гиперосмотическую среду с избыточным количеством солей, а избыточное давление газа растворяет его все больше и новые атомы требуют образования новых клатратных решеток, для которых необходима свободная вода. В отсутствии свободной воды в околоклеточном пространстве и в условиях гиперосмоса, она начинает выходить из клеток по градиенту концентрации. Тем самым клетки обезвоживаются и теряют колоидно-осмотическое равновесие. Ввиду того, что при некотором снижении температуры метаболизм в клетках сохраняется, согласно эмпирического правила Вант-Гоффа, очевидно, что он не может не изменяться в условиях дегидратации и гиперосмоса как вне, так и внутри клеток. Напротив, механизмы протективного действия гипербарической атмосферы Хе лишней раз находят свое подтверждение в низкой динамике гемолиза с течением времени как для группы с гипербарией Хе, так и с гипербарией Хе+ЦФДА-1.

3.4 Заключение

В проведенных исследованиях показано наличие консервирующего эффекта ксенона на суспензию Эр. В максимальной степени этот эффект был выражен в случае сочетанного применения с конвенциональным гемоконсервантом ЦФДА-1. Так, показатели среднего объема, среднего содержания Hb в Эр, анизоцитоза и СОЭ в исследуемой группе не демонстрировали достоверных различий в сравнении с контрольной группой, консервированной в ЦФДА-1 (Рисунок 25А, В, С, D).

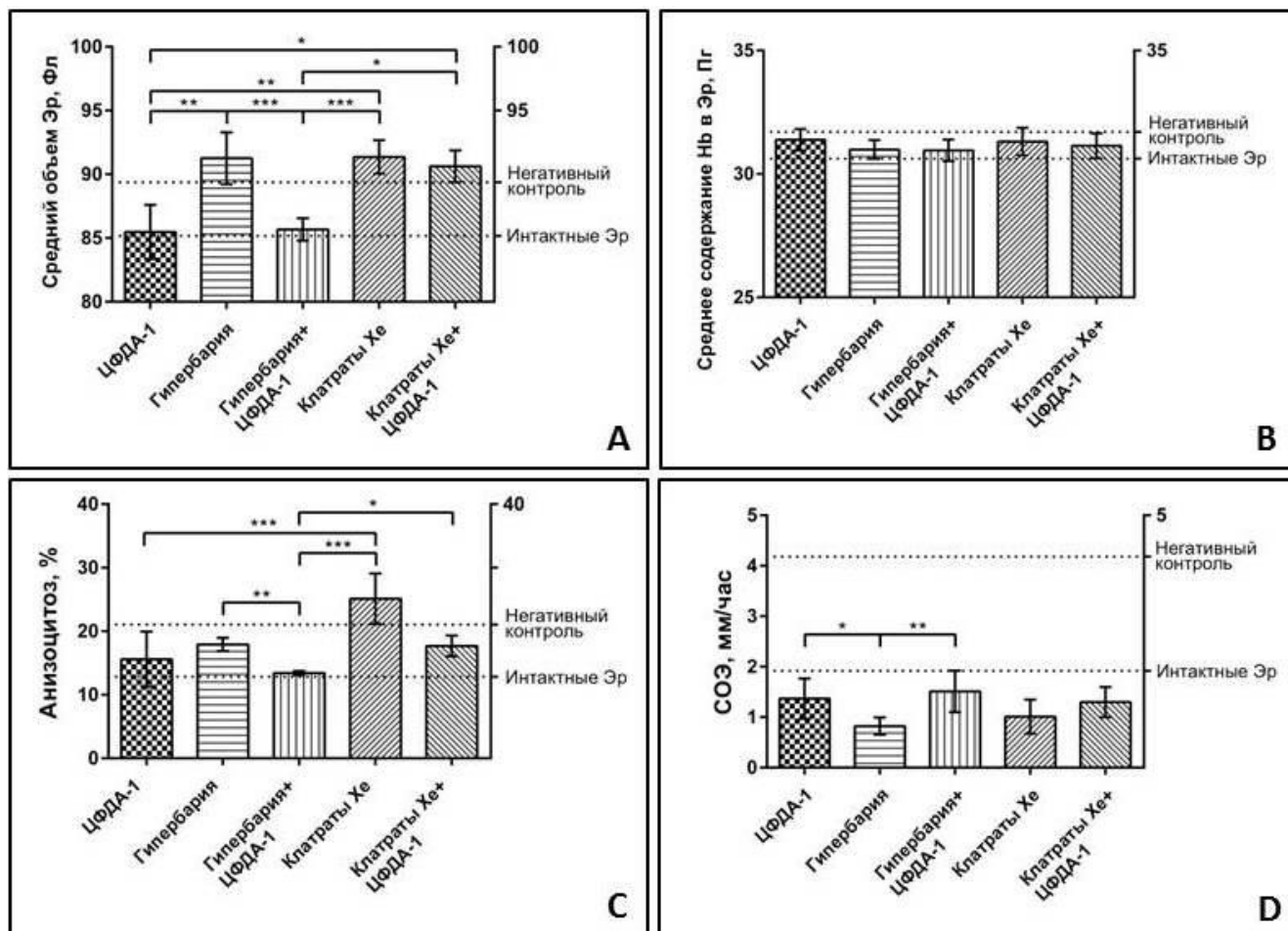


Рисунок 25 - Графики, отображающие основные показатели консервированных Эр. А-средний объем Эр. В – Среднее содержание Hb в Эр. С – Гетерогенность Эр по объему (анизоцитоз).

Д – Скорость оседания Эр

Наряду с этим, показатели гемолиза, дегмацитов и осмотической стойкости показали не только значительные отличия от контроля, но и приближались к таковым у свежих Эр. Единственным параметром, демонстрировавшим худший результат в сравнении с интактными Эр, явилось количество пойкилоцитов. Однако и оно не показало достоверных различий в сравнении с другими группами, в которых был использован Хе, хотя и было достоверно лучше контрольной группы (Рисунок 26D).

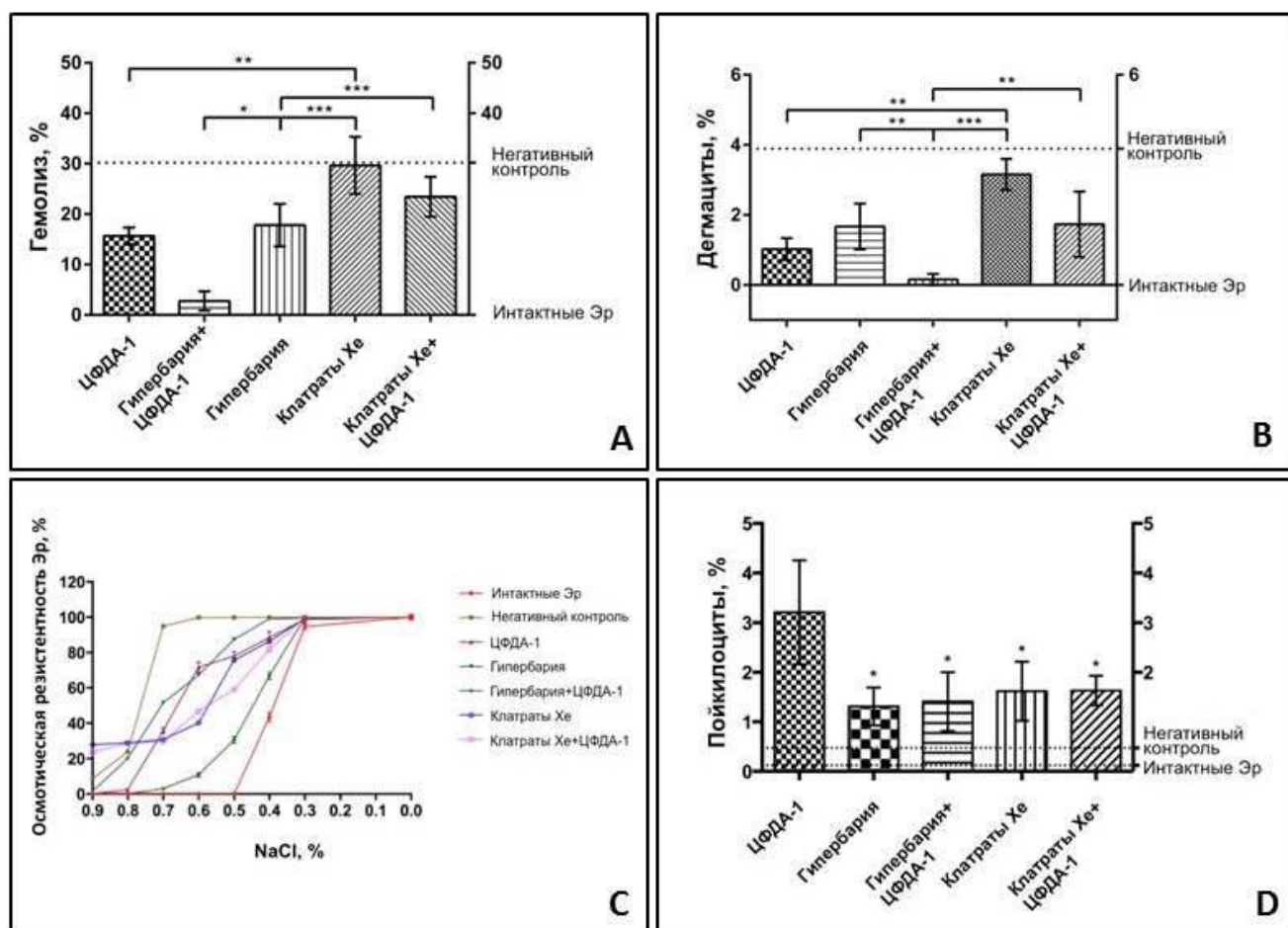


Рисунок 26 - Графики, отображающие основные показатели консервированных Эр. А-Гемолиз Эр. В – Количество дегмацитов. С – Осмотическая стойкость. D – Количество пойкилоцитов.

Выраженный консервирующий эффект гипербарической атмосферы Хе на суспензию Эр обусловлен механизмом равновесной экстракции менее плотного газа – кислорода, на более плотный – Хе. При этом гипербарическая атмосфера только стимулирует данный эффект, увеличивая скорость обмена и концентрацию растворенного Хе. Растворенный в суспензии кислород и другие резидуальные газы, постепенно вытесняются Хе и перемещаются вверх, в соответствии с их атомарными массами, и на фоне высокого парциального давления Хе, что исключает их воздействие на клетки. Таким образом, на фоне исключительности в Эр анаэробного гликолиза, главным повреждающим агентом во время консервации Эр остается кислород. При этом аноксическую атмосферу можно считать более предпочтительной для Эр в условиях консервации.

Важным представляется то, что образование клатратных структур в Эр не сопровождалось наличием сколько-нибудь значимого консервирующего эффекта, а, наоборот стимулировало повреждения клеток, проявляющееся значительным гемолизом суспензии (рисунок 26А). Однако, несмотря на значительный гемолиз, сопоставимый с негативным контролем, многие показатели не претерпели существенного изменения. Например, параметры

СОЭ и количество анизоцитов сопоставимы с контролем, особенно для группы с клатратами Хе+ЦФДА-1 (рисунки 25С, D). Наряду с этим, в показателе средней осмотической стойкости и количестве пойкилоцитов консервируемая в клатратах Хе суспензия Эр демонстрирует лучшие результаты, даже в сравнении с ЦФДА-1 (рисунки 22, 26С, D). Проведенное исследование по оценке гемолитических повреждений различных консервантов Эр показало то, что гемолиз Эр, консервированных в клатратах, развивается постепенно. Возможным механизмом, объясняющим динамические повреждения Эр во время хранения в клатратах, может быть дегидратационный шок и, как его следствие, изменение осмотического баланса как вне, так и внутри клеток. Дегидратация может быть обусловлена избыточным растворением газа и связыванием свободной воды в клатраты во внеклеточной среде. По-видимому, закономерности протекания дегидратационного шока демонстрируют сходство, а механизмы предотвращения повреждений известны, например, с помощью радикального снижения температуры и перехода в криоконсервацию, при -84°C и ниже. Однако, ввиду низкой востребованности ультранизкотемпературного хранения Эр в рутинной практике гемотрансфузиологов этот аспект консервации не является частью настоящего исследования. К тому же существующий стандартный криопротектор Эр - глицерин вполне достаточен для покрытия потребностей банков крови в случае, когда требуется применить метод ультранизкотемпературной консервации.

Выводы:

- 1) Хе обладает консервирующим действием на суспензии Эр.
- 2) Гипербарическая атмосфера Хе более предпочтительна для сохранения морфологических параметров Эр, а также их количества во время консервации.
- 3) Наибольший консервирующий эффект по всем исследуемым параметрам наблюдается при сочетанном применении гипербарии Хе и стандартного консервирующего раствора Эр – ЦФДА-1.
- 4) Гемолиз, развивающийся при консервации в клатратах Хе больше такового в гипербарии Хе или ЦФДА-1.
- 5) Эластические и упругие свойства мембран лучше сохраняются при использовании клатратов Хе, как в сравнении с ЦФДА-1, так и при использовании гипербарии Хе.

4. КОНСЕРВАЦИЯ КОЖНЫХ ЛОСКУТОВ В ГИПЕРБАРИИ И КЛАТРАТАХ КСЕНОНА

В предыдущей главе было показано преимущество консервации в гипербарической атмосфере Хе в гипотермических условиях над клатратным способом, для хранения суспензии Эр. Однако, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что ранее удалось сохранить сердечную ткань млекопитающих в клатратах ксенона, практически не повредив морфологическую целостность внутриклеточных структур. В работе были законсервированы в клатратах Хе мышинные сердца и далее произведена оценка сохранности мембран и матрикса митохондрий [77]. Положительные результаты исследования – сохранность консервированной в клатратах инертных газов сердечной ткани практически не отличалась от интактных образцов, могут свидетельствовать о том, что консервация мультиклеточных структур может проходить по другим механизмам, не характерным для клеток. Последнее может иметь место по причине того, что инертный газ способен в короткие сроки диффундировать на всю глубину ткани в отличие от спиртов, (жидкостные криопротекторы) проникающих лишь в поверхностные слои тканей. Тем самым, криозащитный потенциал традиционных криопротекторов ограничен их возможностью проникновения в толщу ткани, в то время как газ изначально лишен этого недостатка.

В наших исследованиях в качестве модели для изучения влияния гипотермической гипербарии и клатратов Хе на мультиклеточные структуры во время консервации мы выбрали кожу крыс. Выбор данной ткани, как предмета исследования обусловлен многообразием выполняемых функций, а также относительной доступностью ее получения. Наряду с этим, в коже наблюдается четкое зонирование на дермальный и эпидермальный слои, представленные различными клетками и межклеточным веществом, сохранность которых может быть исследована различными способами. Так же кожа состоит из множества стволовых и дифференцированных клеток, продукция энергии в которых осуществляется за счет окислительных процессов в митохондриях. Поэтому консервирующее действие гипербарии Хе и его клатратов будет обеспечиваться за счет однотипных механизмов характерных для других тканей и органов.

Кроме того, сохранение кожных лоскутов является самостоятельной задачей комбустиологии, так как применение аутологичных кожных лоскутов в настоящее время является лучшим способом лечения глубоких ожогов. Однако ввиду ограниченности данного вида биоматериала в клинике, чаще используется аллогенная кожа или ранозаживляющие повязки. При этом большинство исследователей сходятся во мнении, что чем выше

жизнеспособность аллогенных лоскутов, тем благоприятнее исход лечения [67, 169]. С целью сохранения жизнеспособности кожи во время консервации используется два метода хранения: криоконсервация в ДМСО при ультранизких температурах (-84°C) или гипотермическое хранение в солевых растворах при $+4^{\circ}\text{C}$. Первый способ с целью сохранения жизнеспособности ткани на продолжительный срок предпочтительнее, однако, он не получил широкого распространения из-за необходимости использования специального оборудования для криозаморозки. Вместе с тем гипотермическое хранение при $+4^{\circ}\text{C}$ не обеспечивает достаточно надежное хранение кожных лоскутов. Так жизнеспособность кожных лоскутов, консервированных в условиях гипотермии, снижается в два раза уже через 3-ое суток хранения [67, 91, 169].

Таким образом, исследование применимости Хе и его клатратов для хранения кожных лоскутов актуально, как для изучения механизмов, лежащих в основе консервирующего действия данного газа на ткани, так и в связи с необходимостью разработки новых методов хранения, обеспечивающих продление сроков ее хранения. Поэтому разработка и последующее внедрение альтернативного способа консервации будет способствовать снижению дефицита жизнеспособных кожных лоскутов в ожоговых центрах.

4.1 Исследование сохранности кожных лоскутов *in vivo*

Для исследования сохранности кожных лоскутов на модели аутоотрансплантации лабораторным животным применяли модификацию метода, описанного О. Basaran et al [93, 159]. Преимуществом способа является возможность количественного учета качественных признаков. Метод предполагает поэтапное исследование микроскопической структуры кожных лоскутов и последующую оценку макроскопических показателей на 14-е сутки после аутологичной трансплантации. В таблице 12 указаны микроскопические показатели сохранности кожных лоскутов, оцениваемые после расконсервации кожных лоскутов.

Таблица 12 - Микроскопические показатели расконсервированных кожных лоскутов после семисуточного хранения (в баллах от 0 до 2 в исследуемых группах по 7 особей в каждой)

Баллы	0	1	2	Итого баллов
Целостность эпидермиса				
Интактная кожа	-	-	7	14
ДМСО	2	5	-	10

Клатраты Хе	-	1	6	13
Гипербария Хе	3	4	-	4
Эпидермально-дермальный контакт				
Интактная кожа	-	-	7	14
ДМСО	-	2	5	12
Клатраты Хе	-	1	6	13
Гипербария Хе	-	3	4	11
Организация коллагеновых и эластических волокон				
Интактная кожа	-	-	7	14
ДМСО	-	1	6	13
Клатраты Хе	-	-	7	14
Гипербария Хе	-	2	5	12
Наличие фибробластов в дерме на 1 мм среза				
Интактная кожа	-	-	7	14
ДМСО	-	2	5	12
Клатраты Хе	-	-	7	14
Гипербария Хе	1	2	4	10

Из полученных данных следует, что наилучшая сохранность по всем отдельным микроскопическим показателям в сравнении с интактным контролем наблюдалась в группе с клатратами Хе (рисунки 27, 28). В данной группе 6 исследуемых кожных лоскутов набрало по 2 балла, плюс один кожный лоскут набрал один балл (итого, 13 баллов) по показателям целостности эпидермально-дермального контакта и целостности эпидермиса (таблица 12, рисунок 27В). В группах ДМСО и гипербарии Хе во всех случаях количество лоскутов, набравших то или иное количество баллов, различалось во всех случаях. Однако разница в количестве лоскутов, набравших 0, 1 или 2 балла в чаще составляла не более одного лоскута в пределах каждой группы. Только во время оценки целостности эпидермиса в группе с гипербарией Хе отсутствовали образцы, набравшие 2 балла. Поэтому средний показатель оценки совокупности микроскопических параметров жизнеспособности, полученный всеми исследуемыми лоскутами в группе ДМСО, был несколько больше, чем в группе с гипербарией Хе, однако значимых различий между данными группами получено не было (таблица 13, рисунок 27С, D и 28 С, D).

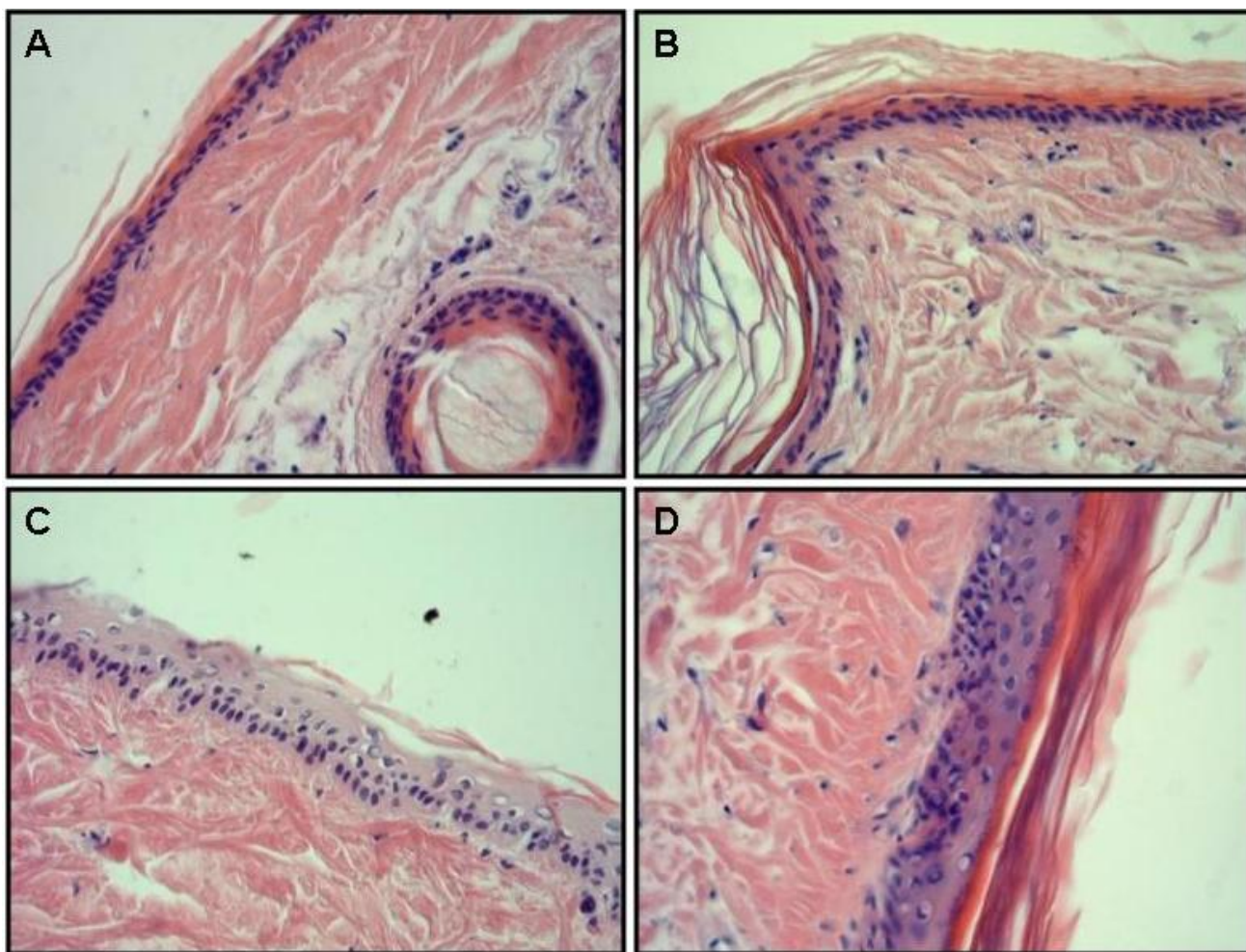


Рисунок 27 - Гистологическое исследование эпидермиса (целостность кератиноцитов, эпидермально-дермальный контакт). Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение в 200 раз. А- Интактная кожный лоскут. В – Кожный лоскут, консервированный в клатратах Хе. С – Кожный лоскут, консервированный в ДМСО. D – Кожный лоскут, консервированный при гипербарии Хе

Таблица 13 - Совокупность микроскопических показателей жизнеспособности кожных лоскутов после консервации

В баллах

Группа	Интактная кожа	ДМСО	Клатраты Хе	Гипербария Хе
Сумма баллов	8,0±0,0	6,0±1,73*	7,71±0,75	5,28±2,21*

*- достоверные различия с контролем (интактная кожа) согласно теста Kruskal-Wallis для качественных признаков при $p \leq 0,05$

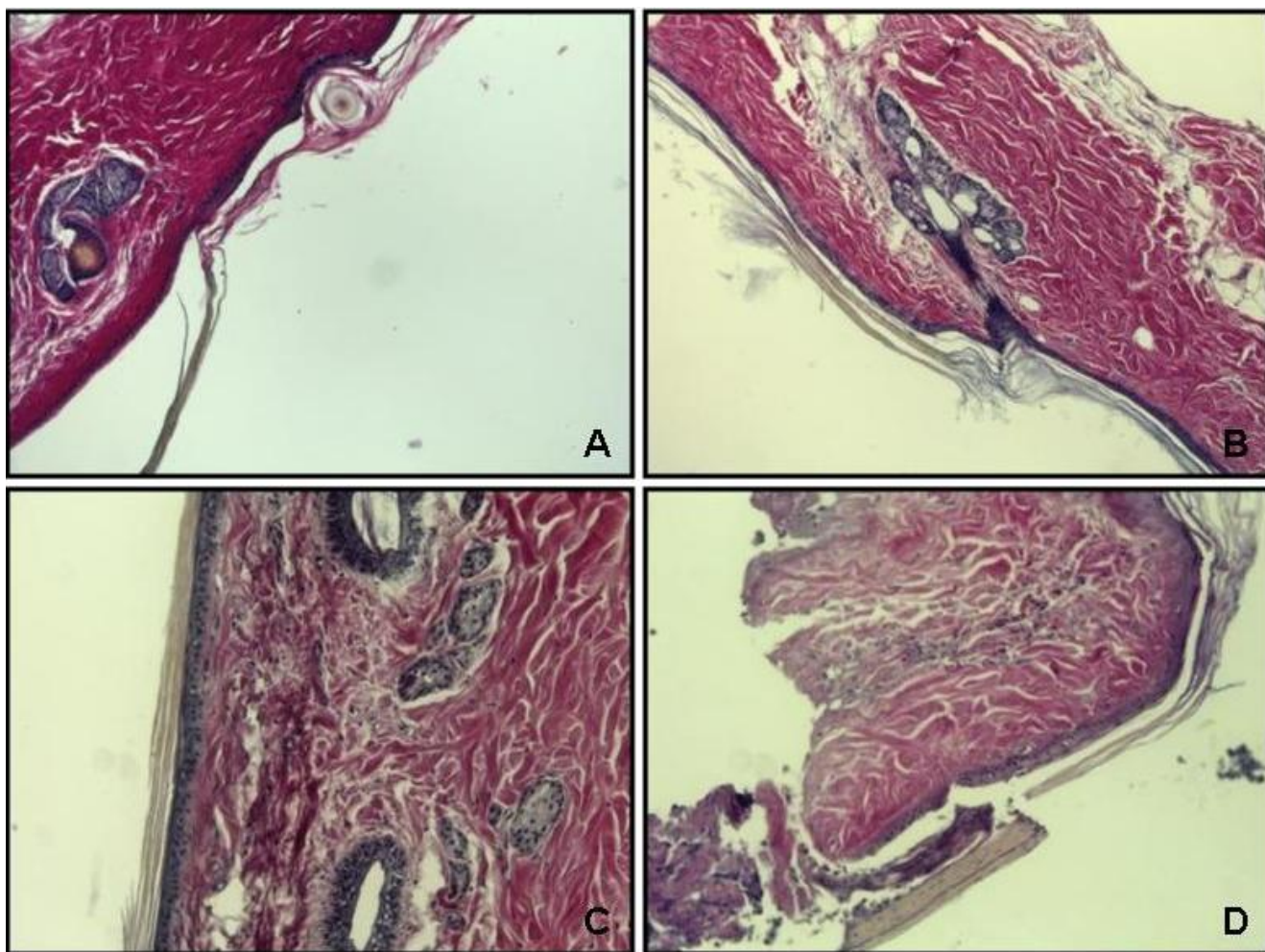


Рисунок 28 - Гистологическое исследование целостности дермы (организация коллагеновых и эластических волокон и количество фибробластов). Окраска Вейгерт-Ван гизон. Увеличение в 100 раз. А- Интактная кожный лоскут. В – Кожный лоскут, консервированный в клатратах Хе. С – Кожный лоскут, консервированный в ДМСО. D – Кожный лоскут, консервированный при гипербарии Хе

Тем самым, по совокупности оцениваемых микроскопических параметров, группа с клатратами Хе набрала максимальный балл 7,7 против 8,0 в контрольной группе, достоверные различия между опытной и контрольной группами отсутствовали. В свою очередь, группы с гипербарией Хе и ДМСО были значимо ниже интактного контроля и составили 5,3 и 6,0 соответственно. В этих группах различия с контролем были достоверными. Полученные данные согласуются с гистологической характеристикой образцов, из которых следует, что лоскуты, консервированные в клатратах Хе, демонстрируют отсутствие значительных видимых морфологических изменений в сравнении с интактной кожей, не подвергавшейся какой-либо консервации. В этой группе вакуолизация кератиноцитов отсутствует, а дермальный слой демонстрирует достаточную плотность и правильную организацию коллагеновых и эластических волокон (рисунок 27В, рисунок 28В). Практически идеальную морфологическую

картину портит только некоторый гиперкератоз эпидермиса, регистрируемый во всех образцах, консервированных согласно данного способа (рисунок 27В, 28В). В тоже время в группах с гипербарией Хе и ДМСО, наоборот, наблюдается избыточная вакуолизация кератиноцитов (рисунок 27С, D), в большей степени выраженная в группе ДМСО. Дermalный слой в данных группах выглядит более разрыхленным и менее структурированным в сравнении как с интактной кожей, так и с лоскутами, консервированными в клатратах Хе. Наряду с этим, наблюдается дезорганизация коллагеновых и эластических волокон (рисунок 28С, D).

Таким образом, кожные лоскуты, консервированные в клатратах Хе, демонстрировали максимальную сохранность, однако феномен гиперкератоза эпидермиса, наблюдаемый во всех лоскутах, может свидетельствовать о ведущем механизме кератоза, связанном со стремительным падением растворимости газа в момент снижения давления во время дегазации. Этот механизм подтверждается на рисунке 29, на котором заметно наличие ровных полостей между ороговевшими слоями эпидермиса, образованными, по-видимому, растущими пузырьками газа.

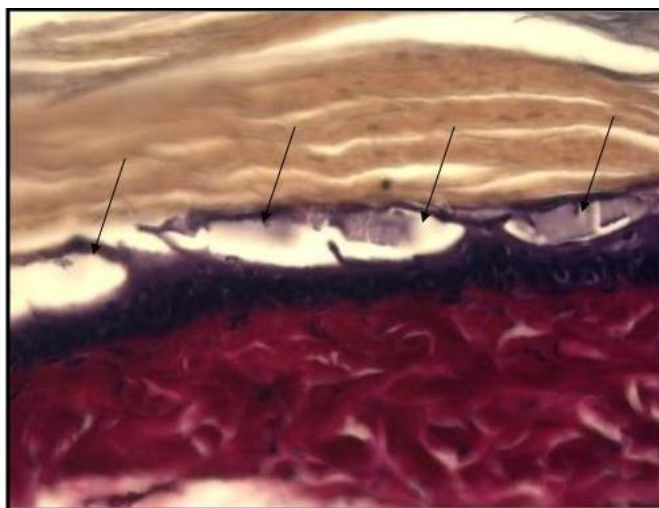


Рисунок 29 - Участок кожного лоскута, консервированного в клатратах Хе. Увеличение в 400 раз. Окраска Вейгерт – Ван Гизон. Стрелками указаны полости в эпидермисе, образованные газовыми пузырьками

В свою очередь, в группе с гипербарией Хе или вообще не наблюдалось данное явление или было выражено в незначительной степени по сравнению с группой клатратов Хе (рисунок 1В, D). Это может указывать на растворение меньшего количества Хе при гипербарии вследствие меньшего парциального давления Хе. С другой стороны, в данной группе в большей степени развивалась вакуолизация кератиноцитов, которая в клатратной группе практически отсутствовала. Последнее может быть связано с дистрофией клеток вследствие токсического действия Хе, которое могло быть реализовано за счет сохраняющейся потребности клеток в

кислороде. Вместе с тем, в клатратах, несмотря на повреждающий эффект дегазации и отслоение ороговевающего слоя за счет роста газовых пузырьков, эффект вакуолизации цитоплазмы кератиноцитов практически отсутствовал. Поэтому возникла необходимость проверки соответствия микроскопических параметров макроскопическим ожиданиям. Означенное обусловило необходимость изучения приживаемости аутологичных лоскутов на модели аутотрансплантации лабораторным животным (белые беспородные крысы).

4.2 Оценка приживаемости кожных лоскутов при различных способах консервации на 14-е и 28-е сутки после трансплантации

В таблице 14 приведены макроскопические показатели приживаемости кожных лоскутов, которые оценивали через 14 суток после трансплантации.

Таблица 14 - Макроскопические критерии приживления кожи после консервации на 14-е сутки после трансплантации

В баллах

Баллы	0	1	2	Итого баллов
Адгезия				
Интактная кожа	1	2	4	10
ДМСО	3	2	2	6
Клатраты Хе	1	3	3	9
Гипербария Хе	2	3	2	7
Цвет				
Интактная кожа	1	3	3	9
ДМСО	2	4	1	6
Клатраты Хе	1	4	2	8
Гипербария Хе	2	3	2	7
Эластичность				
Интактная кожа	1	3	3	9
ДМСО	2	3	2	7
Клатраты Хе	1	4	2	8
Гипербария Хе	1	4	2	8

Из полученных данных следуют меньшие различия по отдельным исследуемым показателям в сравнении с микроскопической характеристикой образцов. Так, по характеристике эластичности разница в количестве лоскутов, набравших то или иное количество баллов между опытными группами, составляет не более одного. Однако сравнивая показатели в отдельности очевидно, лоскуты, консервированные с гипербарией Хе по каждому отдельному показателю, набрали большее количество баллов. Вместе с тем, группы, набравшие максимальное количество баллов по отдельным характеристикам отсутствовали, даже в группе контроля. Сравнение интегральных значений всех макроскопических показателей выявило ожидаемо меньшие различия, чем микроскопических (таблица 15).

Таблица 15 - Интегральные макроскопические показатели жизнеспособности кожных лоскутов после консервации

В баллах

Группа	Интактная кожа	ДМСО	Клатраты Хе	Гипербария Хе
Сумма баллов	4,0±2,24	2,71±2,29	3,57±2,07	3,28±2,29

*- достоверные различия с контролем (интактная кожа) согласно теста Kruskal-Wallis для качественных признаков при $p \leq 0,05$

Полученные данные свидетельствуют о лучшей динамике приживаемости лоскутов, консервированных в клатратах Хе. Так, средний балл приживаемости в данной группе по всем трем оцениваемым показателям составил 3,57 по сравнению с 4,0 в контрольной группе. Для группы с гипербарией Хе и ДМСО средний показатель приживаемости согласно трех параметров макроскопической оценки составил 3,28 и 2,71 соответственно. При этом достоверные различия с контролем ($p \leq 0,05$) получены только для группы с ДМСО. Межгрупповой анализ согласно теста Краскела-Уоллиса не выявил достоверных различий.

Полученные данные согласуются с динамикой приживления кожных лоскутов, оценка которой проводилась на 14-е сутки после трансплантации (рисунок 30). Консервированные в клатратах Хе кожные лоскуты демонстрировали лучшие показатели адгезии, цветности и эластичности, которые были сопоставимы с интактной кожей (рисунок 30А, В). В то же время лоскуты, консервированные в ДМСО, в большинстве случаев отторгались к 14-м суткам или изменяли цветность и эластичность в значительной степени (рисунок 30С). Кожа, консервированная в гипербарии Хе, демонстрировала лучшие показатели эластичности и цвета,

однако в большинстве случаев заживление раны происходило вторичным натяжением, что не способствовало приживлению лоскута (рисунок 30D).

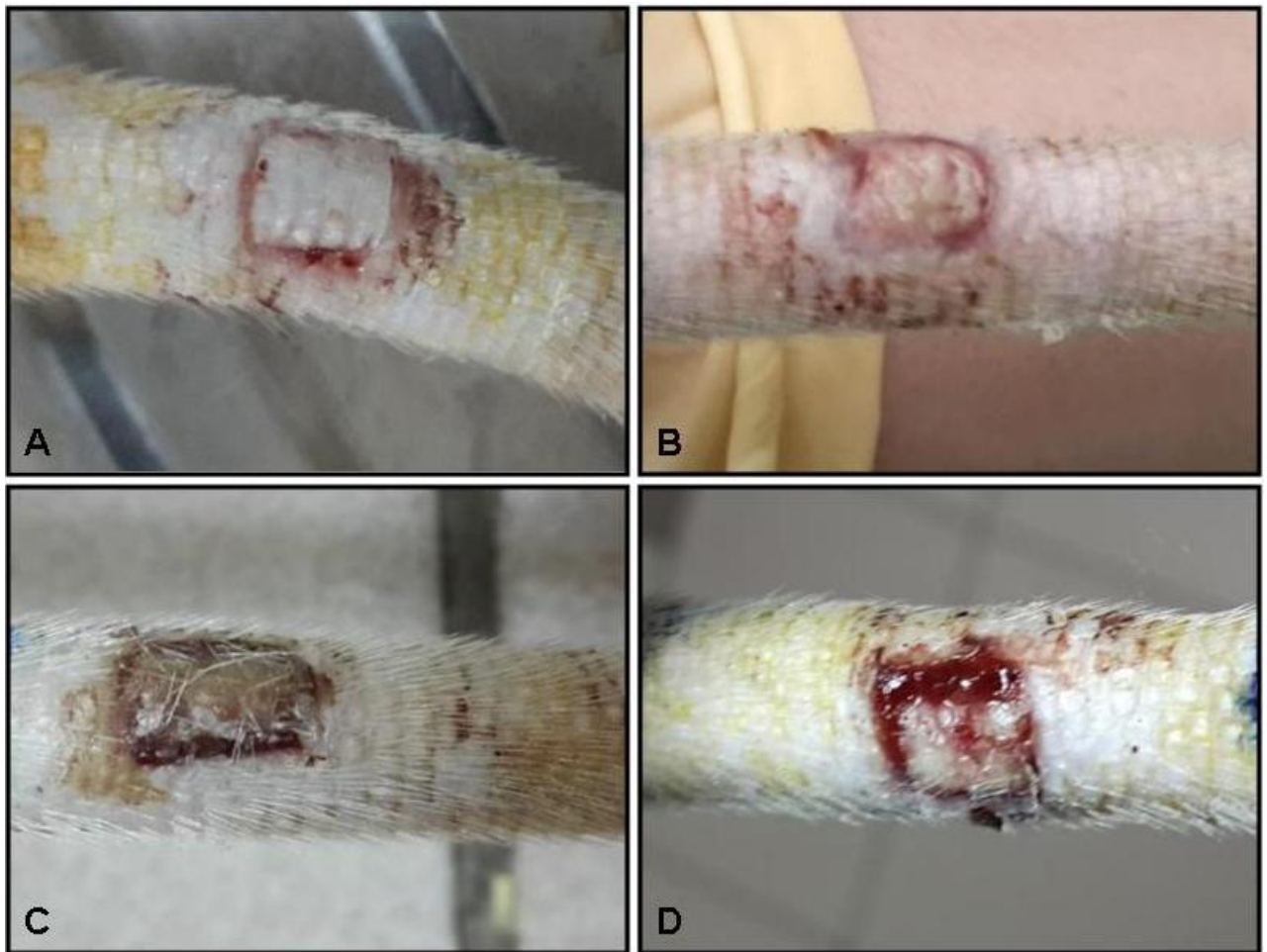


Рисунок 30 - Динамика приживления консервированных аутологичных кожных лоскутов на 14-е сутки после трансплантации. А- Интактный кожный лоскут. В – Кожный лоскут, консервированный в клатратах Хе. С – Кожный лоскут, консервированный в ДМСО. D – Кожный лоскут, консервированный в гипербарии Хе

Результаты приживаемости кожи, регистрируемые в группах ДМСО и гипербарии Хе на 14-е сутки трансплантации, позволили предположить, что не все лоскуты способны прижиться в двухнедельный срок и в некоторых случаях может произойти отсроченное отторжение трансплантата. Последнее обстоятельство побудило нас исследовать количество приживленных кожных лоскутов к 28-м суткам после трансплантации. Трансплантированный лоскут считали приживленным только в случае, если не наблюдалось видимых признаков эпителизации раны по типу вторичного натяжения, а трансплантированный лоскут имел видимые очертания и не имел значительных отличий по цвету от окружающей ткани (рисунок 31).

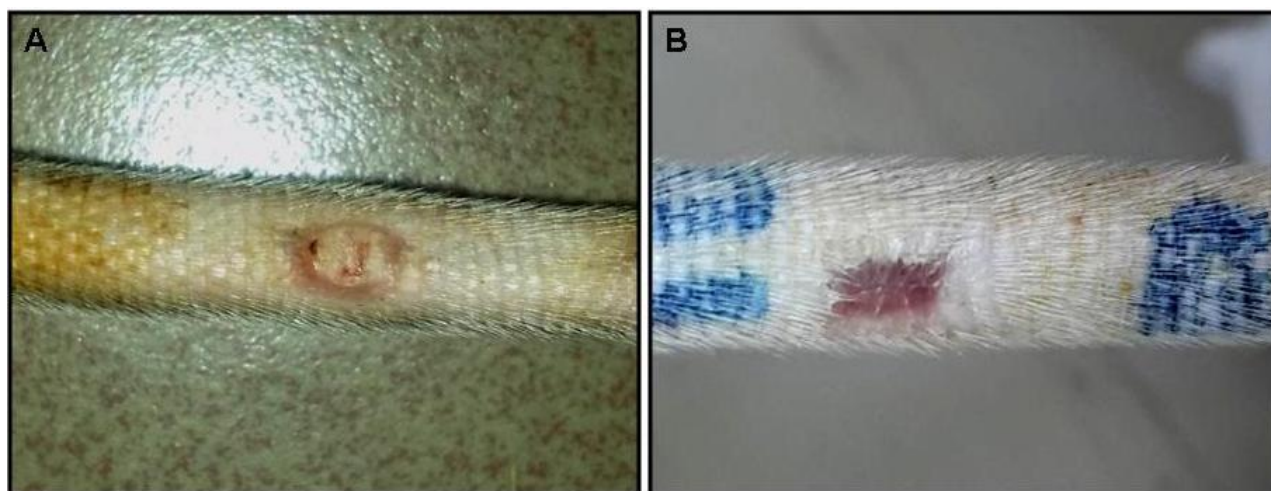


Рисунок 31 - Макроскопическая картина приживления кожных лоскутов на 28-е сутки после трансплантации. А – полное приживление в группе с клатратами Хе. В – Отторжение трансплантата (кожного лоскута) и заживление раны по типу вторичного натяжения в группе с ДМСО

Таблица 16 - Количество отсроченных приживленных кожных лоскутов на 28-е сутки после трансплантации (из семи трансплантированных лоскутов)

Группа	Интактная кожа	ДМСО	Клатраты Хе	Гипербария Хе
Количество приживлений	5	2	4	2
Процент приживлений, %	71,4	28,6	57,1	28,6

Из таблицы следует, что количество отсроченных приживлений трансплантированных лоскутов в группе с клатратами Хе составило 57,1 %, и отставало на 14,3 % от контрольной группы. В то время как в группах с гипербарией Хе и ДМСО количество приживленных лоскутов было существенно меньше и составило 28,6 %, что на 42,8% меньше контрольной группы.

С одной стороны, во всех опытных группах прослеживается недостаточная приживаемость трансплантированных кожных лоскутов, а с другой, по известным литературным данным, процент приживаемости интактных аутологичных лоскутов после трансплантации составляет в среднем 62,5 %, даже в отсутствии каких-либо манипуляций с трансплантатом [18]. Это может быть связано с множеством причин, не имеющих прямого отношения к степени морфофункциональной сохранности ткани. При этом, совокупность

показателей, определяющих сохранность микро- и макроструктуры ткани (таблицы 13, 15), а также приживаемость трансплантата в течение 28 суток, позволяют установить не только лучшее качество трансплантированных лоскутов (рисунок 31), но и больший процент приживления кожи (таблица 16). В образцах, в которых основным консервирующим агентом были клатраты Хе.

Возможным механизмом, лежащим в основе консервирующего действия клатратов Хе на кожные лоскуты, может быть, так называемый «клатратный анабиоз», известный из литературы [11, 52, 77, 167, 177]. Гипотеза анабиотического действия клатратов предполагает связывание свободной внеклеточной воды в гидраты инертных газов с последующим угнетением метаболизма клеток из-за значительного уменьшения подвижности воды, связанной в клатратные решетки. Известно, что подвижность молекул воды в биообъектах, заключенной в клатраты, чрезвычайно мала и сравнима с подвижностью воды в обычном льду [39, 42]. Имобилизованная подобным образом вода неспособна принимать участие в метаболических реакциях. Поэтому такое состояние может быть подобно действию обычных криопротекторов, снижающих количество свободной воды и повышающих вязкость раствора [70]. Разница в том, что обычным криопротекторам для этого требуются условия от -78°C и ниже, а при клатратном анабиозе, последний в равной степени повышает вязкость раствора и имобилизует воду, как при $+4^{\circ}\text{C}$, так и при -78°C [39, 45, 143]. Это представление соответствует ранее полученным данным, в которых показано отсутствие достоверного влияния клатратов Хе на структурную целостность кожных лоскутов и вакуолизацию кератиноцитов. При этом кожные лоскуты, консервированные стандартным способом (ДМСО), продемонстрировали равномерное снижение всех исследуемых показателей, что выражалось, как в снижении микро- и макропоказателей, так и наличием структурных повреждений эпидермиса и дермы. В целом, выявленные повреждения для этой группы выражены в меньшей степени по сравнению с группой гипербарии Хе, однако в ключевых показателях оценки отсроченной приживаемости лоскута данная группа демонстрировала худший результат, а количество лоскутов, которые окончательно прижились после трансплантации, было одинаковым в обеих группах. Данные закономерности могут быть объяснены токсическим действием как криопротектора ДМСО, так и гипербарии Хе, которые в большей степени развивались на этапах консервации и оттаивания.

Резюмируя полученные результаты можно констатировать наличие консервирующего эффекта во всех опытных группах, однако в максимальной степени данный эффект был выражен в группе с клатратами Хе. Полученные данные с одной стороны, позволяют говорить о жизнеспособности и применимости кожных лоскутов после консервации в клатратах Хе. С другой стороны, наряду с выяснением роли гипербарии Хе и ДМСО в нарушении микро- и макроструктуры, а также динамики приживлений, механизмы протективного действия

клатратов Хе требуют оценки действия консервантов на функциональную активность клеток, в частности на их локомоцию и пролиферацию.

4.3 Исследование сохранности кожных лоскутов *in vitro*

Известно, что кожа состоит из дермы и эпидермиса. Основными пролиферирующими слоями эпидермиса являются базальный и шиповатый слои, содержащие активно делящиеся кератиноциты и стволовые клетки, в то время как клетки поверхностных слоев в основном ороговевают и утрачивают способность к делению, накапливая гранулы кератогиалина и, выполняют преимущественно, защитные функции. Дерма представлена двумя слоями – сосочковым, выполняющим роль питания и газообмена для вышележащих слоев кератиноцитов, а также сетчатым, содержащим большое количество межклеточного матрикса, представленного коллагеном и эластином. Основными продуцентами данных веществ и, следовательно, главными структурными единицами дермы считаются фибробласты. Поэтому была поставлена задача оценить жизнеспособность клеток кожи – кератиноцитов и фибробластов после консервации различными методами.

Сохранность кератиноцитов эпидермиса оценивалась согласно способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать тетразолиевые соли (2,5-diphenyl – 2H – tetrazolium bromide) в кристаллы формазана, которые далее регистрируются количественным способом (таблица 17).

Таблица 17 - Поглощение тетразолиевых солей кожей после семисуточного хранения

Группа Параметр	Интактная кожа	ДМСО	Клатраты Хе	Гипербария Хе
Оптическая плотность при 570 нм	1,512±0,124	0,817±0,078*	1,187±0,223*	0,524±0,081*
Относительное значение	100 %	54,03 %	78,51 %	34,66 %

*- достоверные различия с контролем (интактная кожа) при $p \leq 0,05$

Из таблицы следует, что наилучшие показатели сохранности кератиноцитов эпидермиса на седьмые сутки консервации в сравнении с контрольной группой наблюдаются в группе с клатратами Хе. Поглощение раствора при 570 нм было на 21,49 % меньше в сравнении с интактной кожей, не подвергавшейся какому-либо воздействию. В группе с ДМСО

жизнеспособность эпидермиса была ниже на 45,97 %. Самый низкий показатель был зафиксирован в группе с гипербарией Хе, который составил 34,66%, что на 65,34% ниже уровня интактной кожи. Во всех случаях были получены достоверные различия ($p \leq 0,05$).

Обращает внимание положительный консервирующий эффект клатратов Хе, в то время как гипербарическая атмосфера Хе демонстрировала худший результат. Известные эффекты баротравмы, описанные в литературе, позволяют предположить ведущий механизм повреждений, связанный с повышением атмосферного давления. Тем не менее, образование клатратов так же связано с гипербарией, однако в данной группе не наблюдается выраженных негативных эффектов. Гистологическая картина подтвердила данные наблюдения. Исследованные срезы консервированных в клатратах Хе кожных лоскутов морфологически не отличались от интактных за исключением некоторого гиперкератоза ороговевающего слоя эпидермиса, так же наблюдаемого в предыдущем исследовании (рисунок 32В). В то же время в группе с гипербарией Хе наблюдалась ожидаемая вакуолизация цитоплазмы кератиноцитов (рисунок 32D), а в группе с ДМСО прослеживалось исчезновение меланоцитов (рисунок 32С), которое мы не могли проследить в предыдущем эксперименте в связи с тем, что предметом исследования была кожа крыс-альбиносов. Как обсуждалось ранее, феномен вакуолизации кератиноцитов может быть связан с дистрофическими нарушениями в клетках, которые имеют место при нарушении процессов газообмена. В то же время, локальные участки исчезновения меланоцитов в группе с ДМСО свидетельствуют о большем токсическом воздействии данного консерванта в сравнении с гипербарией Хе.

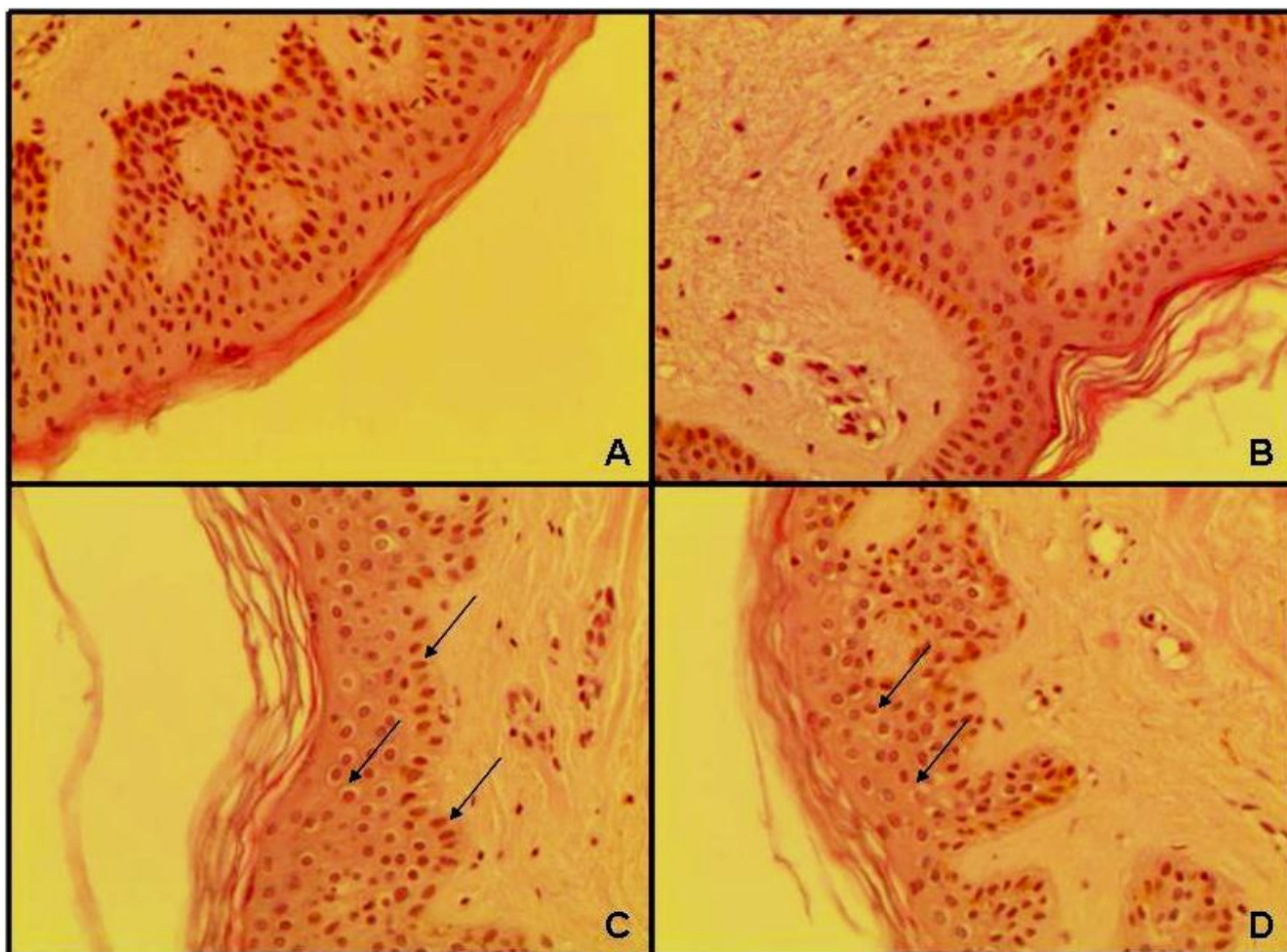


Рисунок 32 - Гистологическое исследование консервированных в клатратах кожных лоскутов.

Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение в 200 раз. А- Интактные кожные лоскуты. В – Кожные лоскуты, консервированные в клатратах Хе. С – Кожные лоскуты, консервированные в ДМСО (стрелками указаны вакуолизированные кератиноциты и исчезновение меланина). D – Кожные лоскуты, консервированные в гипербарии Хе (стрелками указаны вакуолизированные кератиноциты, меланин сохранен)

Процесс поглощения тетразолиевых солей в цитоплазме клеток является энергозависимым и протекает по типу эндоцитоза. Однако конечным веществом, обуславливающим сохранность клеток, является формазан, образование которого связано с восстановлением тетразолиевых солей посредством митохондриальных дегидрогеназ – НАДН дегидрогеназы или сукцинатдегидрогеназы, функционирующих на внутренней мембране митохондрий. Таким образом, для образования и регистрации формазана в кератиноцитах требуется выполнить два условия: сохранить целые митохондрии с неповрежденными комплексами электрон-транспортной цепи, особенно первого и второго ферментных комплексов, а также работоспособность везикулярного транспорта.

Полученные данные свидетельствуют о большей сохранности митохондриальных компартментов у клеток, консервированных в клатратах Хе, в то время как в других группах этот комплекс угнетается в большей степени (таблица 17). Вместе с тем, остается невыясненным вопрос о сохранности дермального слоя ввиду того, что основные клетки дермы - фибробласты, достаточно глубоко залегают и защищены эпидермисом, базальной мембраной и подкожно - жировой клетчаткой. Это в большой степени затрудняет доступ тетразолиевых солей в толщу лоскута, к фибробластам. И хотя, мы не можем достоверно судить о функциональной активности и сохранности данных клеток с использованием примененной методики, однако из представленных рисунков следует, что дермальный слой кожи не претерпел значимых изменений во всех опытных группах. Последнее может свидетельствовать о большей устойчивости данного слоя к декомпрессионным воздействиям. Поэтому оценка жизнеспособности и функциональной активности кератиноцитов может быть проведена при количественном анализе экспансированных фибробластов. Результаты исследования представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Динамика экспансии фибробластов из кожных лоскутов, консервированных в ДМСО, клатратах и гипербарии Хе. Количество экспансированных клеток на 1 мм среза исследуемого лоскута

Время экспансии Группы	6 суток	9 суток	12 суток	15 суток
Интakтная кожа	14,22±3,11	71,78±7,79	297,64±9,648	847,37±36,812
ДМСО	4,33±2,236*	22,78±5,309*	76,78±7,155*	274,89±11,623*
Клатраты Хе	6,33±1,87*	34,89±4,675 *	101,56±5,768*	436,82±15,674*
Гипербария Хе	0,44±0,726*	3,44±1,130*	21±7,628*	64,22±5,761*

*- достоверные различия с контролем (интактная кожа) при $p \leq 0,05$

Из таблицы следует, что наилучшая динамика экспансии и последующей пролиферации дермальных фибробластов наблюдалась в группе с клатратами Хе. Количество функционально активных фибробластов на 6-е сутки культивирования было на 55,49 % меньше в сравнении с неконсервированными лоскутами. Количество клеток в ДМСО и Гипербарии Хе было соответственно меньше на 69,55% и на 96,9% относительно интактной кожи (рисунок 33). На

15 сутки культивирования лучшую пролиферативную активность из всех опытных групп, также демонстрировали кожные лоскуты, консервированные в клатратах Хе. Экспансия фибробластов была на 48,45 % меньше в сравнении с контролем, в то время как количество клеток в ДМСО и Гипербарии Хе было меньше на 67,56% и на 92,42% относительно контроля соответственно. Из таблицы следует, что разница между количеством клеток в интактной коже и в группе клатратов Хе с увеличением времени экспансии сокращается гораздо сильнее по сравнению с остальными группами.

Таким образом, динамика экспансии фибробластов во всех опытных группах оказалась ожидаемо ниже, чем в интактной группе. Однако группа с клатратами Хе демонстрирует наилучшие показатели в сравнении с другими экспериментальными группами, а уже к 15 суткам культивирования консервированных в клатратах Хе кожных лоскутов различия опыт/контроль в динамике роста и экспансии фибробластов значительно уменьшаются.

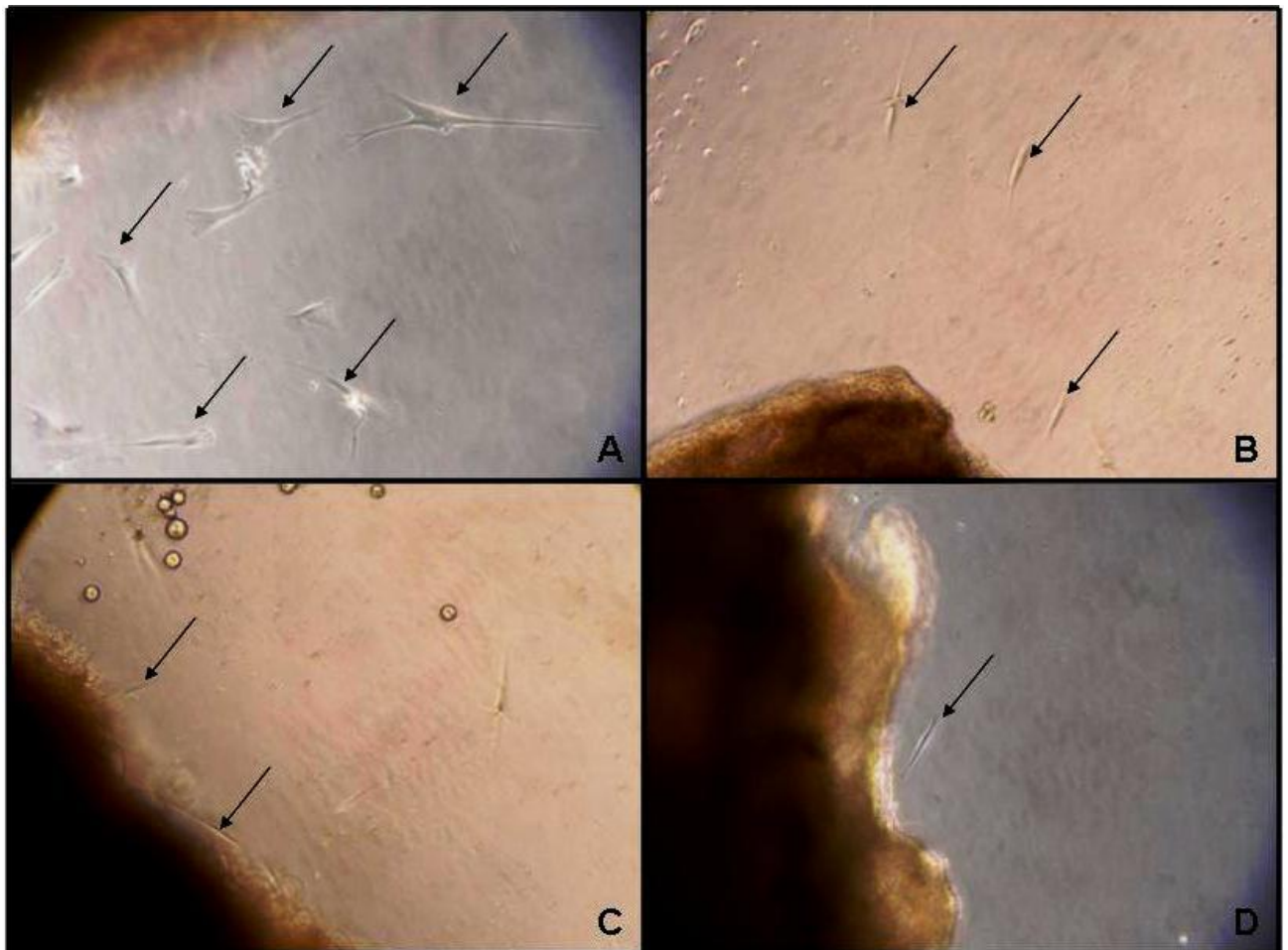


Рисунок 33 - Экспансия фибробластов из лоскутов на 6-е сутки культивирования. Увеличение в 200 раз. А- интактные лоскуты. В – Лоскуты, консервированные в клатратах Хе. С – Лоскуты, консервированные в ДМСО. D – Лоскуты, консервированная в гипербарии Хе (стрелками указаны экспансированные фибробласты)

Локомоторная активность клеток по современным представлениям может быть реализована за счет активности структур цитоскелета, прежде всего актиновых микрофиламентов, а также за счет процесса перманентного перемещения участков цитоплазмы, в основе которого лежит эндоцитоз. Однако и в первом и втором случае для направленного движения клеток требуется энергия, продуцируемая в митохондриях и запасаемая в АТФ. Таким образом, полученные результаты можно объяснить тем, что дермальный слой кожи в опытных группах сохранил целостность и архитектуру, затрудняющую краевую экспансию фибробластов, а лишь часть фибробластов кожи сохраняет локомоторную активность после консервации. Оставшиеся фибробласты, по всей видимости, или нежизнеспособны или функционально неактивны. При этом в группе с клатратами Хе количество активно функционирующих фибробластов после консервации было самым большим в сравнении с другими опытными группами, а экспансированная культура клеток демонстрировала устойчивую динамику роста. При этом необходимо отметить, что в данной группе уже к 15 суткам культивирования отмечалась тенденция к формированию монослоя фибробластов, в то время как ДМСО и гипербария значительно отставали в пролиферативной активности.

Таким образом, наибольшие темпы динамики деления в пределах 3х суток были характерны для группы с клатратами Хе. Это свидетельствует о сохранности локомоторной и пролиферативной функций, демонстрируя, что возможным механизмом протективного эффекта клатратов Хе мог быть клатратный анабиоз, замедляющий или полностью блокирующий метаболизм путем инактивации свободной воды. Доказательством этому может быть кислородная зависимость синтеза АТФ для всех клеток кожи. В свою очередь, такие энергозависимые процессы, как восстановление тетразолиевых солей до формазана и локомоторная активность клеток тесно связаны, так, как и в том и другом случаях для их реализации требуется нормально функционирующий механизм везикулярного транспорта. Поэтому, оба процесса могут быть реализованы только при условии отсутствия повреждений митохондрий. Таким образом, замещение атмосферы на ксеноновую в отсутствие адекватной остановки метаболизма, могли привести к гибели ткани. Означенный механизм, по-видимому, мог получить развитие в группах с гипербарией Хе, в которой максимальные повреждения наблюдались на уровне нарушения функциональной активности клеток, которые выражались снижением потребления тетразолиевых солей и затрудненной экспансией фибробластов.

4.4 Заключение

Результаты, полученные в группе с клатратами Хе, указывают на лучшую жизнеспособность лоскутов, консервированных данным способом. Сохранность кожи в данной группе по всем оцениваемым показателям была лучше других опытных групп. В ходе проведенных экспериментов показано, что клатраты Хе практически не влияют на макро- и микроскопические показатели ткани, в то время как воздействие гипербарической атмосферы Хе и ДМСО изменяют их в большей степени (рисунки 27, 30). Количество и качество отсроченных приживленных лоскутов так же подтверждает эти данные. Наибольшее количество отсроченных приживлений в сравнении с контролем было зафиксировано в группе с клатратами Хе, в то время как для других исследуемых групп данный показатель был в 2 раза меньшим (рисунок 34).



Рисунок 34 - Количество отсроченных приживленных кожных лоскутов на 28-е сутки после трансплантации (из семи трансплантированных лоскутов)

Результаты оценки эпидермального и дермального слоев так же демонстрируют наилучшую сохранность в группе с клатратами Хе. Так, показатели поглощения тетразолиевых солей, указывающие на сохранность структурных элементов эпидермиса – кератиноцитов, были на 31,2 % выше таковых в группе с ДМСО и на 55,8 % выше, чем в группе с гипербарией Хе (рисунок 35А). Экспансия фибробластов, характеризующая сохранность дермального слоя в наименьшей степени отличалась от контроля для группы с клатратами Хе. Динамика выхода прогениторных клеток дермы в данной группе лишь на 3и сутки отличалась от контрольной, в то время как в других опытных группах скорость экспансии была замедленной не менее, чем на 6 суток (рисунок 35В).

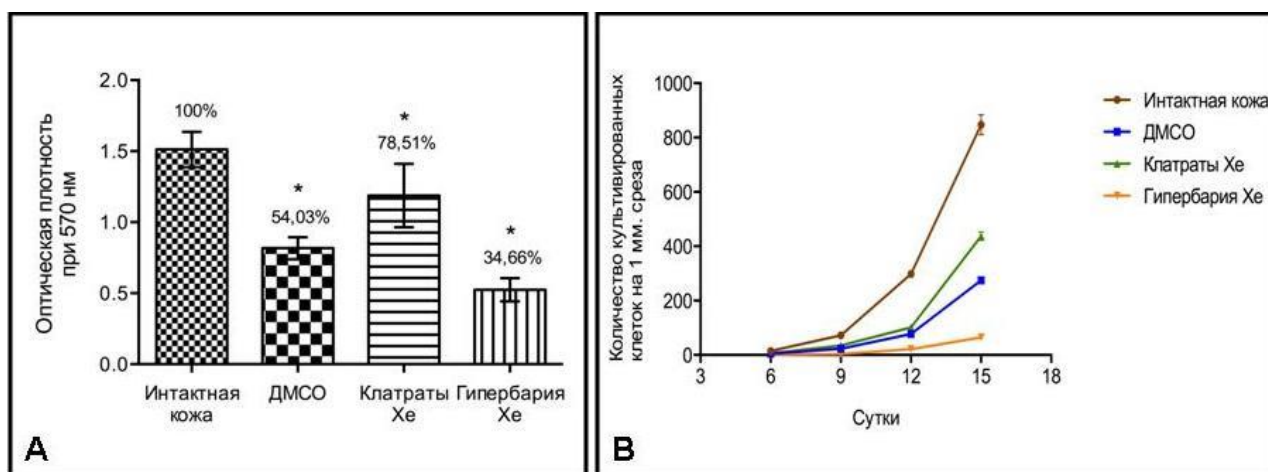


Рисунок 35 - Графики показателей оценки жизнеспособности эпидермального и дермального слоев кожи. А – Интенсивность поглощения и преобразования тетразолиевых солей в формазан кератиноцитами эпидермиса. В – количество экспансированных дермальных фибробластов на 1 мм среза кожного лоскута на разных периодах оценки

В оставшихся опытных группах обращает на себя внимание лучший консервирующий эффект стандартного раствора ДМСО в сравнении с гипербарией Хе. ДМСО проявил себя в лучшей степени, как для сохранения целостности эпидермиса, так и дермы. Наряду с этим, согласно шкалы оценки микроскопических параметров сохранности кожи [О. Basaran et al 2006], ДМСО-консервированные лоскуты набрали большее количество баллов. Однако макроскопическая оценка приживаемости лоскутов выявила лучшее качество приживления в группе с гипербарией Хе (рисунок 36).

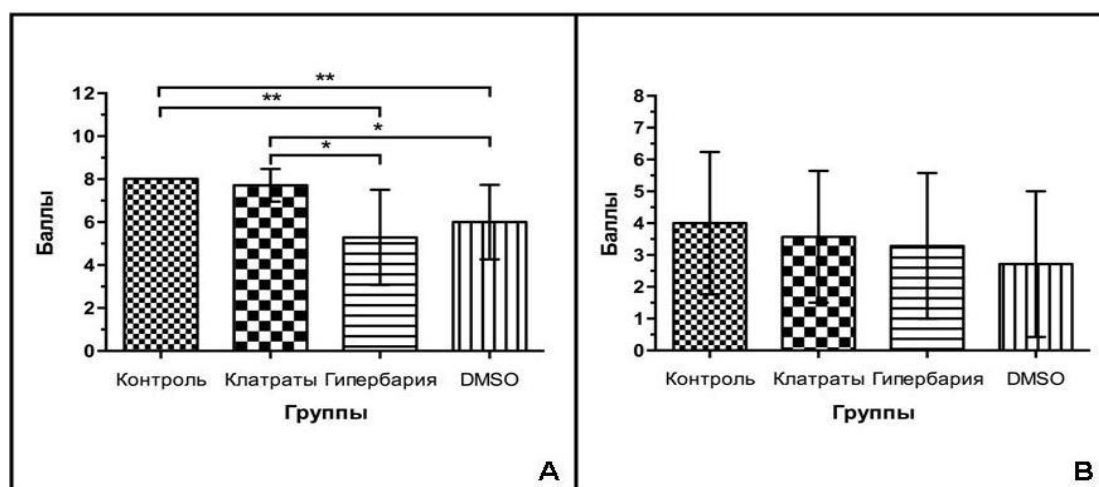


Рисунок 36 - Графики показателей оценки жизнеспособности кожных лоскутов. А – макроскопические показатели оценки. В - Микроскопические показатели оценки.

Ведущим консервирующим механизмом в группе с клатратами Хе может быть клатратный анабиоз – иммобилизация молекул воды в клатратах и угнетение биохимических реакций. В свою очередь, гиперкератоз эпидермиса кожных лоскутов, консервированных в клатратах Хе, может быть обусловлен деструктивным действием дегазации на этапах деконсервации. Механизмом, объясняющим разрушающее воздействие гипербарии Хе, может быть сохранение метаболической активности в отсутствие доступа кислорода и, как следствие, постепенная гибель функционирующих клеток. Вместе с тем, наличие некоторого консервирующего действия гипербарии Хе может указывать на защитные свойства самого газа. Прямое токсическое действие на клетки раствора ДМСО, может объяснять, как низкое качество, так и количество отсроченных приживлений кожи. Вместе с тем, известные криопротективные свойства ДМСО, предохранили лоскуты от значительных повреждений во время глубокой заморозки до -84°C , а значит они могут быть сохранены при таких параметрах в течение длительного времени.

Таким образом, в проведенных исследованиях было показано наличие большего консервирующего эффекта клатратов Хе на кожные лоскуты в сравнении с другими методами. При этом, механизм протективного действия клатратов Хе для ядродержащих клеток и Эр, является различным. Так, во время консервации Эр, лучший эффект наблюдался при применении гипербарии Хе отдельно или в сочетании с ЦФДА-1. Данный феномен, может быть объяснен несовершенством механизмов холодовой защиты Эр в сравнении со зрелыми ядродержащими клетками [109], а клатраты Хе могут быть предпочтительным консервирующим агентом клеток, имеющих митохондриальное дыхание. По-видимому, механизмы клатратообразования в клетках, наряду с иммобилизацией свободной воды, могут инактивировать митохондриальное дыхание и затормозить перенос электронов по электрон-транспортной цепи, обуславливая состояние анабиоза.

В свою очередь, гипербария Хе, продемонстрировавшая наилучшую сохранность для Эр, оказывается не лучшей для клеток, содержащих митохондриальные компартменты. Вероятно, замещение атмосферы кислорода на ксеноновую в отсутствие остановки метаболизма и иммобилизации молекул воды при гипербарии играет негативную роль. По-видимому, в этих условиях образование свободных радикалов не будет остановлено на фоне угнетения антирадикальной защиты. Означенное ставит вопрос о проведении исследования, предметом которого может быть изучение консервирующих свойств Хе и его клатратов на модели краткосрочного хранения изолированных ядродержащих клеток.

Выводы

1. Сохранность кожных лоскутов при действии клатратов Хе значимо выше по сравнению с другими консервантами (ДМСО, гипербария Хе).

2. Консервирующие свойства клатратов Хе эффективны как в отношении клеток дермы, так и эпителия кожных лоскутов это выражается наилучшей сохранностью экспансивной и дыхательной функций кожи.

3. Консервированные в клатратах Хе кожные лоскуты демонстрируют минимальные различия с интактными образцами по показателям сохранности микроструктуры ткани. Показатели приживления демонстрируют большие различия с контролем – неконсервированной кожей, однако, значительно лучше других экспериментальных групп.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ КОНСЕРВИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА КСЕНОНА НА ЯДРОСОДЕРЖАЩИЕ КЛЕТКИ

В предшествующих главах были продемонстрированы противоречивые результаты по сохранности Эр и кожных лоскутов в отношении эффектов клатратов и гипербарии Хе. Разность механизмов, лежащих в основе консервирующего действия клатратов и гипербарии, на ткани и Эр может быть связана с особенностями самих исследованных биообъектов. С одной стороны - безъядерные с анаэробным метаболизмом, с другой, ядродержащие и с аэробным гликолизом и дыхательной цепью. Однако, связывая противоположные эффекты Хе с клетками, следует учитывать и мультиклеточность кожных лоскутов, ограничивающей доступность консервирующего раствора криофилактика для глубинно расположенных клеток. Это вносит дополнительное препятствие для сравнения: эритроциты – кожные лоскуты. Означенное ставит вопрос о постановке дополнительного эксперимента, предметом исследования которого будут являться нуклеарные клетки, обладающие полноценным митохондриальным метаболизмом и способные к делению. При этом, эти клетки не должны быть в составе ткани или органа, морфоструктурные свойства которых могут оказать влияние на результат.

Подходящими клетками-кандидатами для этих целей могут быть фибробластоподобные клетки (ФК), выделенные из полнослойных кожных эксплантатов. Данные клетки относительно просто получить, а смешанная первичная культура таких клеток содержит клетки различной степени дифференцировки – от стволовых клеток эпителия и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) подкожно-жировой клетчатки и кожи до дермальных фибробластов. Вместе с тем, простота и воспроизводимость методических приемов клеточной экспансии обуславливает возрастающую потребность в этих клетках для создания кожных эквивалентов для лечения ожогов или язв, для коррекции возрастных изменений, а также для целей репрограммирования. Однако, существует множество проблем, связанных с применением традиционного подхода для консервации данного типа клеток с использованием ДМСО-содержащих консервирующих растворов. Самые малые из них - прямой токсический эффект и экзотермическая реакция, которые развиваются в ответ на добавление ДМСО и немедленно повреждают клетки [165]. Более серьезные проблемы были описаны в работах [59, 133, 157], которые демонстрировали эпигенетические нарушения, фрагментацию ДНК, укорочение теломер и спонтанную дифференцировку. Наряду с этим известно, что для целей персонализированной клеточной терапии требуется аутологичный биоматериал с возможностью отсроченного применения. Поэтому важнейшей задачей становится задача по

хранению этих клеток. Между тем, существующие методы предполагают использование жидкого азота, являющегося не самыми надежным и удобным способом транспортировки.

Таким образом, поиск методов ксеноновой консервации может стать обоснованием для дальнейших исследований по разработке перспективного способа хранения клеток, который будет лишен недостатков традиционного способа криоконсервации в растворе 10% ДМСО при -78°C и ниже.

5.1 Исследование жизнеспособности и морфофункциональных характеристик ММСК, консервированных в различных вариантах использования ксенона

В настоящее время в литературе имеются противоречивые данные, касающиеся сохранения в ксеноновой атмосфере различных нуклеарных клеток, содержащих митохондриальный дыхательный цикл. В одних работах показано преимущество использования Хе для консервации монослоев фибробластов [148], в то время как в других демонстрируется отсутствие значимого эффекта гипербарической атмосферы на консервируемые суспензии клеточных культур [21, 50]. Учитывая, что в данных исследованиях не обозначалась разница между гипербарией и клатратами Хе, мы исследовали жизнеспособность как прикрепленных (адгезированных), так и их суспензированных вариантов адгезированных клеточных культур после консервации. Для решения задачи использовали различные способы консервации в Хе – гипербарическое хранение или в клатратах. Результаты представлены в таблице 19, а также на рисунках 37, 38.

Таблица 19 - Количество жизнеспособных клеток, после 24 ч хранения при различных способах консервации

В процентах

Суспензионные культуры				
Количество жизнеспособных клеток	Интактные клетки (неконсервированные)	Клатраты Хе	Гипербария Хе	ДМСО
	98,53±0,131	51,71±5,234*	8,46±1,176*	56,11±3,654*
Адгезированные культуры				
Количество жизнеспособных клеток	97,89±1,143	78,86±3,476*	6,85±2,864*	54,74±2,784*

*- достоверные различия с контролем (неконсервированные клетки) при $p \leq 0,05$

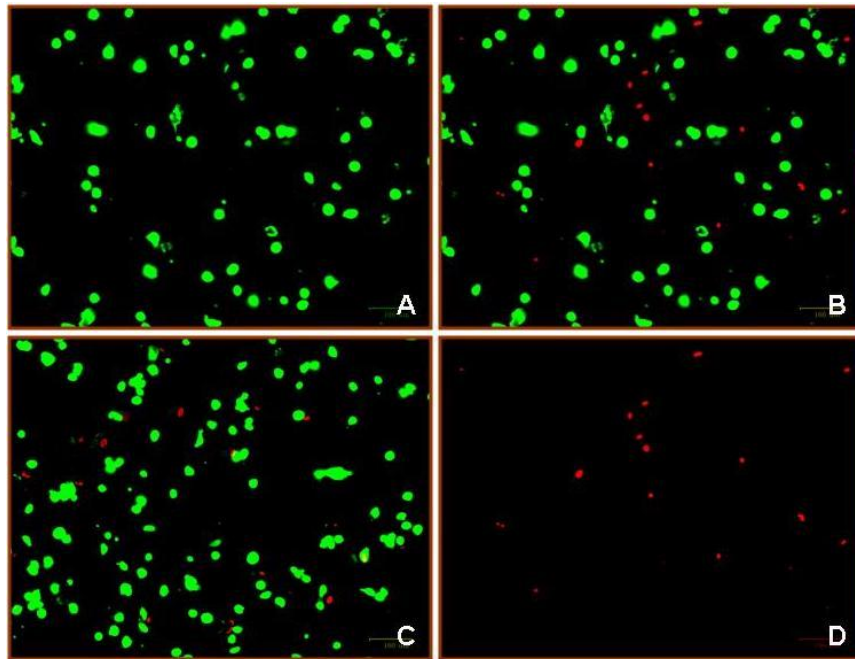


Рисунок 37 – Флуоресцентная микроскопия суспензионной культуры ФК после консервации. Увеличение в 400 раз. Окраска: Life-Dead Viability Kit. А- Неконсервированные клетки (интактная культура). В – Клетки, консервированные в клатратах Хе. С – Клетки, консервированные в ДМСО. D – Клетки, консервированные в гипербарии Хе (зеленые – живые, красные – мертвые клетки)

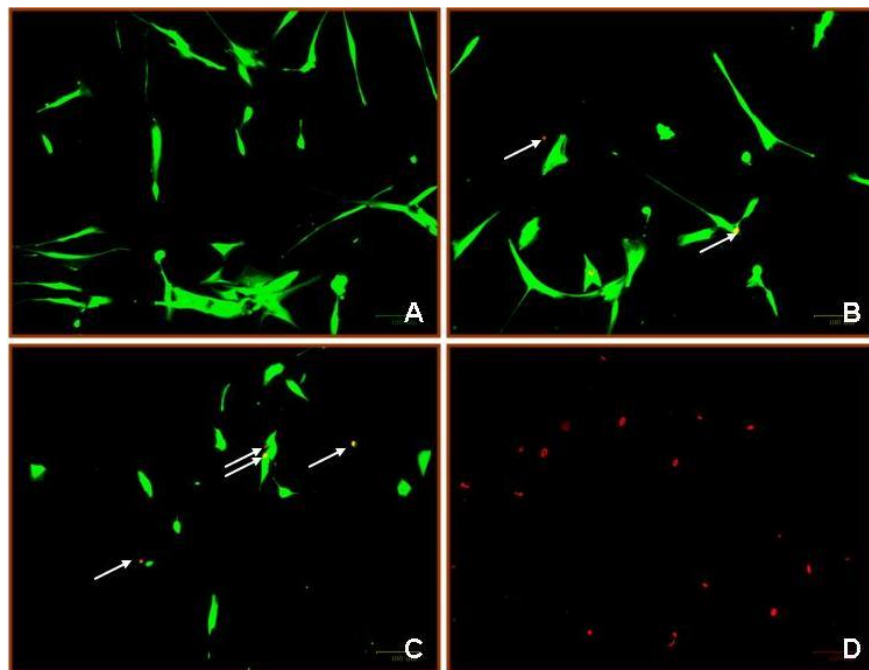


Рисунок 38 – Флуоресцентная микроскопия адгезированной культуры ФК после консервации. Увеличение в 400 раз. Окраска Life-Dead Viability Kit. А- Неконсервированные клетки (интактная культура). В – Клетки, консервированные в клатратах Хе. С – Клетки, консервированные в ДМСО. D – Клетки, консервированные в гипербарии Хе. Стрелками указаны мертвые клетки (зеленые – живые, красные – мертвые клетки)

Наибольшую жизнеспособность в сравнении с контролем для групп суспензированных культур показали образцы, консервированные в клатратах Хе и ДМСО. Количество жизнеспособных клеток уменьшилось на 46,82 % (в 1,9 раза, на 47,52%) и на 42,42% (в 1,76 раза, на 43%). Для адгезированных клеток наибольшая жизнеспособность (78,86%) была зафиксирована в образцах, консервированных в клатратах Хе, по сравнению с контролем, а жизнеспособность снизилась в 1,24 раза (на 19,44%). Для ДМСО этот показатель составил 54,74%, что соответствовало снижению в 1,79 раза (на 44,08%). Наряду с этим, клетки, консервированные в клатратах Хе в форме адгезированных культур, проявили на 27,15 % (в 1,52 раза, на 52%) лучшую сохранность в сравнении с неадгезированными суспензионными культурами, $p \leq 0,05$. Жизнеспособность клеток, консервированных в ДМСО как в адгезированных, так и в суспензионных культурах не имела статистически достоверных различий и составила 54,7 % против 56,1 %. Гипербария Хе в обоих случаях продемонстрировала худший эффект. В сравнении с остальными опытными группами, показатели жизнеспособных клеток составили 8,46 % и 6,85 % для суспензионных и адгезированных культур соответственно, достоверных различий между показателями в данной группе выявлено не было. Таким образом, в сравнении с контролем – интактными клетками, были получены достоверные различия для всех исследуемых групп, однако между группами адгезированных и суспензионных культур наличие существенных различий было зафиксировано только для образцов, консервированных в клатратах Хе.

Из рисунка 37 следует, что жизнеспособные клетки суспензионной культуры, во всех группах демонстрируют шарообразную форму с четкой визуализацией количества живых – зеленых и мертвых - красных клеток. В случае с клетками, консервированными в гипербарии Хе, жизнеспособные клетки практически отсутствовали, а в большинстве полей зрения наблюдались преимущественно красные – мертвые клетки (рисунок 37D). Однако клетки, консервированные в форме адгезированных культур, демонстрировали значительные различия не только в количестве живых/мертвых клеток, но и сильно отличались по форме (рисунок 38). Когда адгезированные клетки, консервировали в клатратах Хе, они сохраняли морфологию интактных – неконсервированных клеток - треугольной формы, с четким ведущим краем и хвостом (рисунок 38А, В), в то время как клетки, консервированные в ДМСО, приобретали шарообразную форму, теряя признаки адгезии на пластике (рисунок 38С). В то же время, адгезированные клетки, консервированные в гипербарии Хе, продемонстрировали результат сопоставимый с суспензионной культурой – преобладание мертвых клеток шарообразной формы (рисунок 38D).

Окраска и подсчет жизнеспособных клеток, окрашенных Life-Dead, позволяют обосновать не только сохранность молекулярной структуры мембран, но и констатировать

целостность синтетического аппарата клеток. Основанием для этого является принцип действия красителя LifeDead красителя, который отличается от стандартного коллоидного раствора трипанового синего, одним важным свойством – с его помощью в первую очередь, визуализируются живые клетки, с сохраненным метаболизмом. Это достигается за счет молекулы кальцеина (Calcein), которая является эстером и благодаря своим липофильным качествам может проникать через неповрежденную клеточную мембрану путем эндоцитоза. Далее, если в цитоплазме не нарушена активность внутриклеточных эстераз, то данная молекула превращается в светящийся флуоресцеин и образует ярко-зеленое свечение в люминесцентном микроскопе. Таким образом, для реализации данного принципа требуются сразу два условия: неповрежденный активный центр фермента и работоспособность систем клетки, обеспечивающих синтез белков и гидролиз сложных эфиров в цитоплазме. Наряду с этим, второй компонент раствора этидиум гомодимер – 1 действует по принципу трипанового синего и может проникать в клетки только через поврежденные мембраны и далее вызвать стойкое оранжево-красное свечение. Таким образом, использованная методика позволяет изучить сохранность как морфологической, так и функциональной активности клеток.

С целью визуализации структуры ксенон-клатратного льда, а также детализации морфологического состояния мембран, заключенных в него нуклеарных ФК, была проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) (рисунок 39). В связи с тем, что основным преимуществом криоконсервации клеток в растворе ДМСО является способность последнего замедлять или полностью предотвращать рост кристаллов льда и, тем самым, защищать мембраны клеток от механического воздействия ледяного фронта, в качестве контроля мы выбрали клетки, консервированные в гипербарии Хе и криоконсервированные в отрицательных температурах (-20°C).

Это позволило изучить наличие и выраженность протективного эффекта гипербарической атмосферы Хе в условиях отрицательных температур. Поэтому использование такого контроля предпочтительнее, так как позволяет выявить насколько радикальными были повреждения суспензии клеток, консервированных в условиях отрицательных температур и гипербарии Хе в сравнении с клетками, консервированными в клатратах Хе при одинаковых условиях.

Как было указано ранее, технология консервации в клатратах Хе включает в себя три этапа: образование клатратов, собственно процесс хранения и деконсервация. Метод СЭМ позволяет получить данные о наличии повреждений на этапах образования клатратов и хранения. Одним из условий метода является создание глубокого вакуума, что в нашем варианте практически имитирует лиофильную сушку образца. С одной стороны, известно, что вакуумная сушка на холоду позволяет сохранить первичную структуру объекта, последнее дает

возможность визуализировать мембраны клеток при консервации и хранении в клатратах Хе. С другой, этап деконсервации данным методом изучить не представлялось возможным, так как создание отрицательной атмосферы нарушает естественный выход газов из клатрированного биообъекта.

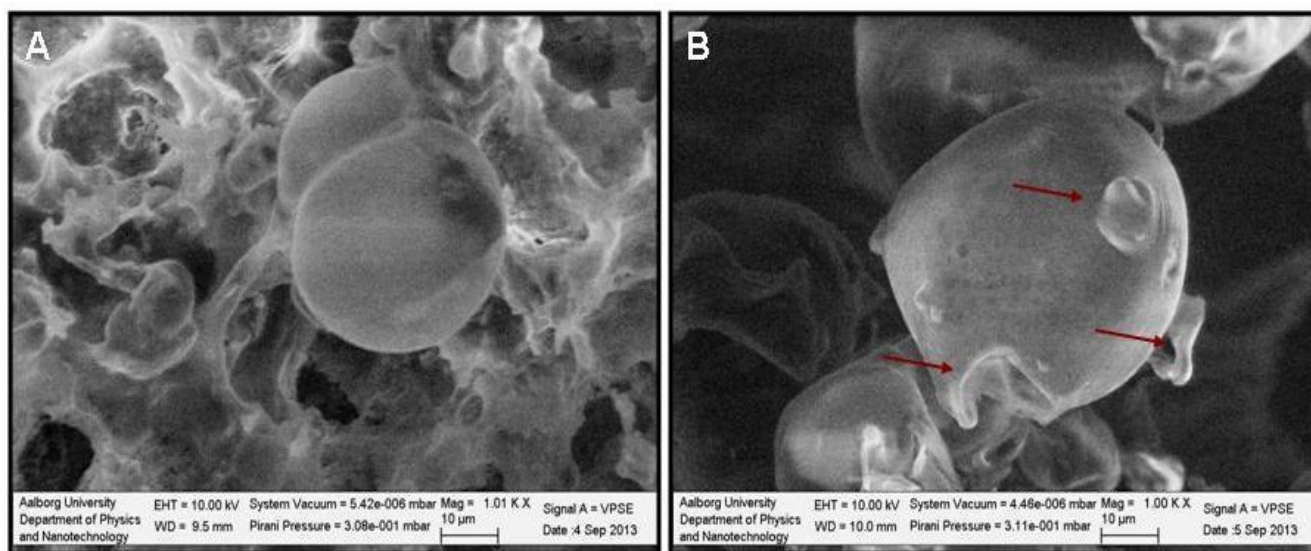


Рисунок 39 – Сканирующая электронная микроскопия клеток во время консервации.

Увеличение в 1000 раз. А – Клетки, консервированные в клатратах Хе. В – Клетки, консервированные в гипербарии Хе. Стрелками указаны поврежденные участки цитоплазматической мембраны

На снимках представлено подтверждение полной сохранности цитоплазматических мембран клеток, консервированных в клатратах Хе, повреждения мембран отсутствуют, а сами клетки правильной округлой формы (рисунок 39А). В то же время, суспензия клеток, консервированных в гипербарии Хе демонстрировала тотальное разрушение мембран (рисунок 39В), по-видимому вызванное образованием крупных кристаллических структур льда, как вне-, так и внутриклеточного происхождения. Очевидно, что такие повреждения цитоплазматических мембран несовместимы с сохранностью клеток. В свою очередь, интактные мембраны клеток, консервированных в клатратах Хе, в достаточной степени согласуются с данными, по оценке жизнеспособности клеток Life-Dead. В данной группе, помимо прочего, обращает на себя внимание пористое межклеточное содержимое, напоминающее по структуре аэрогель, а также меньшие относительно контрольной группы размеры клеток. Аэрогелевая структура межклеточного вещества демонстрирует очевидные различия клеток, консервированных в присутствии клатратов и без них. По-видимому, данная структура защищает клетки от образования кристаллов обычного льда, которые были губительны для группы с гипербарией Хе (рисунок 39В). Уменьшенный размер клеток в

сравнении с контролем, может быть вызван как гиперосмотическим механизмом, который мог иметь место в группе клатратов Хе в момент их образования, так и увеличением размеров клеток в контрольном образце, по причине увеличивающегося объема внутриклеточной воды в момент заморозки.

Таким образом, в проведенных исследованиях показана жизнеспособность суспензий, консервированных в клатратах Хе и ДМСО, при этом в адгезированных культурах показатели жизнеспособности для группы клатратов Хе были максимальными в сравнении с другими опытными группами.

По-видимому, синергетический эффект сочетанного применения адгезированных клеток с клатратами Хе может быть связан как с большей устойчивостью прикрепленных клеток к воздействию клатратов, так и организацией клеток в процессе адгезии. Это может служить дополнительным объяснением лучшего консервирующего эффекта клатратов Хе при хранении кожных лоскутов.

Возможно молекулы фибронектина, коллагена, ламинина и др., синтезируемые клетками в процессе адгезии на поверхности культурального пластика, в чем-то могут напоминать пространственную сеть межклеточного матрикса кожи и обуславливают лучший эффект действия клатратов Хе на культуры клеток. При этом, по-видимому основным механизмом консервации является клатратный анабиоз, который сохраняет неповрежденными не только наружные мембраны клеток (рисунок 39А), но и мембраны митохондрий, отвечающих за продукцию энергии для синтетических компартментов клетки.

В то же время, гипербария Хе демонстрирует отсутствие, сколько-нибудь, значимого консервирующего эффекта, как в адгезированных, так и в суспензионных культурах, что может служить очередным доказательством токсического действия гипербарической атмосферы Хе в отсутствии адекватного замедления метаболизма. Вместе с тем, обращают на себя внимание морфология адгезированных клеток, консервированных в ДМСО (рисунок 38С) в значительной степени, отличающаяся не только от контрольных образцов, но и от клеток, консервированных в клатратах Хе. Угнетение адгезии и, как следствие, локомоторной активности, а также стремление к обретению шаровидной формы в группе ДМСО могут указывать на нарушение функциональной активности клеток. Поэтому возникла необходимость исследования дополнительных параметров, определяющих функциональную активность клеток. Последними стали: клоногенная активность и интенсивность включения 2^{14}C меченого предшественника синтеза нуклеиновых кислот – тимидина (таблица 20).

Таблица 20 - Функциональные характеристики клеток после консервации

Параметры	Интактные клетки (неконсервированные)	Клатраты Хе	ДМСО
Включение 2^{14}C -тимидина в ДНК (Бк/ 10^5 клеток)	$71,14 \pm 1,43$	$58,71 \pm 1,15^*$	$47,58 \pm 1,82^*$
Клоногенная активность (%)	$46,84 \pm 2,17$	$32,43 \pm 1,54^*$	$23,12 \pm 1,23^*$

*- достоверные различия с контролем (неконсервированные клетки) при $p \leq 0,05$

Из таблицы следует, что консервированные в клатратах Хе клетки снижали количество включенного в ДНК тимидина на 17,5 % по сравнению с контролем, в то время как клетки, консервированные стандартным способом (ДМСО), демонстрировали 33-х процентное снижение исследуемой величины. Так, разница в снижении количества включенного тимидина между группами клатраты Хе и ДМСО была почти двукратной (17,5% против 33,1%).

По характеристике клоногенной активности наблюдались большие различия, однако закономерности изменения исследуемых показателей сходны. Группа с клатратами Хе демонстрировала на 30,8 % меньше колониеобразующих единиц, относительно группы контроля. В группе ДМСО снижение исследуемого показателя составило 50,6 %. Во всех случаях различия были достоверными ($p \leq 0,05$). Группа клатраты Хе демонстрировала меньшее снижение колониеобразующих единиц, чем таковое в группе ДМСО. Во всех случаях различия были достоверными ($p \leq 0,05$).

Таким образом, консервирование клеток в клатратах Хе, в меньшей степени сказывается на их функциональной активности. В сравнении с традиционной техникой консервации в ДМСО, клатраты Хе демонстрируют на 23,4 % лучший результат по синтетической функции (включение тимидина) и на 40,3 % лучше по способности расконсервированных клеток сохранять клоногенную функцию. Кроме того, во время субкультивирования клетки, консервированные в клатратах Хе, проявляли высокую способность к адгезии на культуральном пластике. Ещё на этапе выделения свойство адгезии использовалось как метод сортировки: только те клетки, которые смогли адгезироваться на пластике в течение первых суток культивирования, сохранялись в культуре, остальные удаляли со сменой среды при первом или последующих пассажах. Адгезированные клетки имели веретенообразную или отростчатую (фибробластоподобную) форму (рисунок 38В). При пролиферации клетки демонстрировали способность к локомоции по культуральной поверхности, постепенно распространяясь на максимально возможную площадь с утратой контакта между собой. При приближении культуры к состоянию монослоя пролиферация клеток заметно замедлялась, а

затем останавливалась. Тем самым культура демонстрировала способность к контактному торможению, которое относится к одному из проявлений чувства собственного пула. Данная характеристика типична для всех клеток, полностью или частично отличающихся свойствами «стволовости» и/или реализующих восстановление клеточной популяции. Напротив, клетки, консервированные в ДМСО, демонстрировали замедленную динамику пролиферации и меньшую способность к локомоции, которая характеризовалась отсутствием формирования участков ведущего края и хвостов клеток (рисунок 38С). При этом необходимо отметить, что способность к контактному торможению сохранялась и в данной группе.

Снятие клеточных культур с поверхности методом трипсинизации во всех группах сопровождалось изменением формы клеток с отростчатой на шарообразную, что так же связано с клеточной адгезией. Трипсин, разрушая поверхностные адгезивные белки, лишает клетки основы фиксации на поверхности, после чего они приобретали шарообразную форму и смывались с поверхности культурального пластика. После нейтрализации трипсина и перенесения снятой культуры на новую поверхность в группе клатраты Хе, уже через 3 часа клетки прочно закреплялись на пластике, переставали поддаваться обычному механическому смыванию и постепенно приобретали отростчатую форму. В то же время для группы ДМСО время прикрепления клеток к пластику увеличивалось, как минимум, до 9 часов, а значительная часть клеток оставалась неприкрепленной даже через 24 часа культивирования, что может свидетельствовать о повреждении систем клеток, продуцирующих трипсин-лабильные белки и адгезивного аппарата клеток.

Таким образом, фиксация клеток на культуральном пластике и их отростчатая форма указывают на способность к адгезии – одному из основных свойств, характеризующих ФК фибробластического дифферона как жизнеспособные и функционально активные, а эффект трипсинизации указывает на сохранность механизма адгезии, реализуемого за счет трипсин-лабильных поверхностных белков. В образцах, консервированных в клатратах Хе, сохранность данных характеристик была выражена в большей степени, чем в группах ДМСО. Наряду с этим, лучшая сохранность синтетической и клоногенной функций позволяют констатировать преимущество метода консервации нуклеарных клеток в клатратах Хе в сравнении со стандартным способом консервации в растворе ДМСО, особенно при консервации адгезированных клеток.

5.2 Заключение

В проведенных исследованиях было изучено воздействие различных условий Хе на сохранность как адгезированных, так и суспензионных культур нуклеарных ФК. Показано, что адгезированные культуры в 1,5 раза лучше сохраняют жизнеспособность при консервации в клатратах Хе и жизнеспособность в 1,44 раза по сравнению с неадгезированными культурами, консервированными в тех же условиях и клетками, консервированными в ДМСО, соответственно. При использовании ДМСО достоверной разницы в жизнеспособности разных типов культур выявлено не было, а также в сравнении с суспензированными клетками, консервированными в клатратах Хе (рисунок 40).

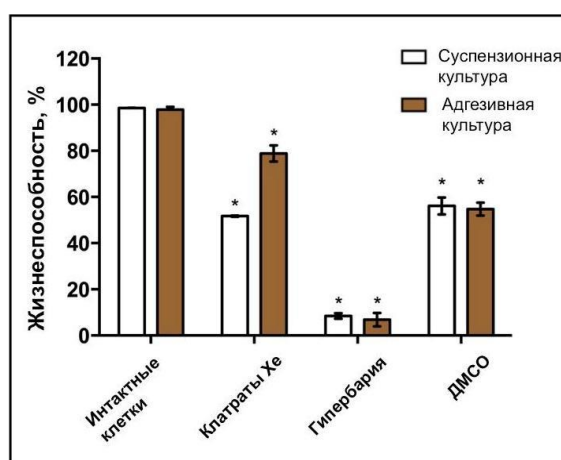


Рисунок 40 - Жизнеспособность адгезированных и суспензионных культур клеток после консервации различными способами (звездочками указаны достоверные различия с контролем – интактные неконсервированные клетки)

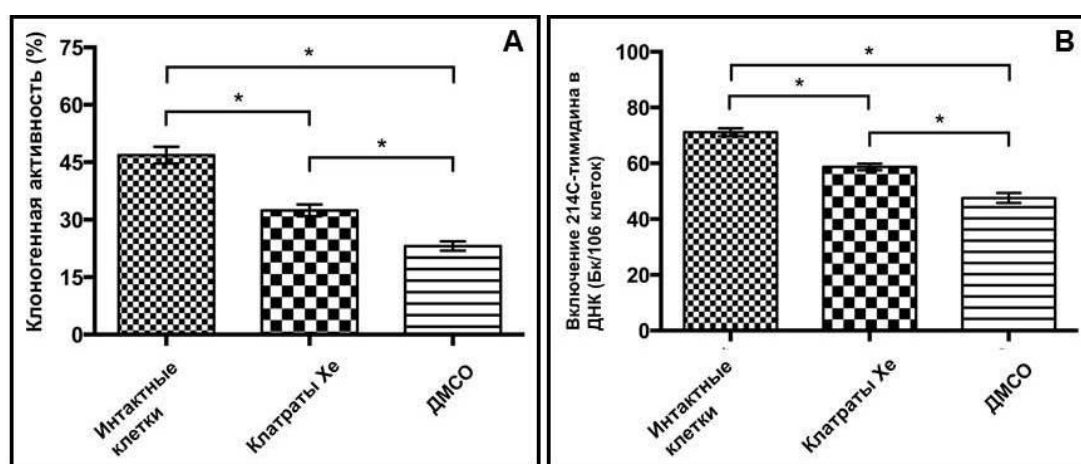


Рисунок 41 - Графики функциональной активности ФК после консервации различными способами. А – клоногенная активность клеток после консервации. В – синтетическая активность клеток после консервации

Показано, что в адгезированных культурах, консервированных в клатратах Хе, наблюдается большая сохранность как морфологических, так и функциональных характеристик клеток (рисунок 41). Большая сохранность жизнеспособных клеток и их функциональных характеристик в образцах адгезированных клеток может быть следствием их особой организации в процессе адгезии и выработкой ими различных веществ, которые в некоторой степени могут напоминать поведение клеток в ткани, демонстрировавшей значительный консервирующий эффект клатратов Хе в предыдущей главе. Снижение функциональной активности и нарушение механизмов локомоции и адгезии группы с ДМСО указывает на токсическое действие данного консерванта, которое, по-видимому, имеет место в моменты консервации или расконсервации. Так как в периоде хранения, клетки находятся в радикально низких температурах, которые практически останавливают метаболизм. В то же время, сохранность данных показателей в клетках, консервированных с помощью клатратов Хе, указывает на протективный эффект клатратов Хе и, как следствие, состоятельность предположения о клатратном анабиозе.

Обоснование состояния клатратного анабиоза так же может найти некоторое обоснование на снимках, полученных с помощью СЭМ, на которых показано, что клатраты Хе демонстрируют способность сохранять интактными цитоплазматические мембраны клеток при хранении (рисунок 39А). Так как дизайн эксперимента по исследованию сохранности мембран предполагал создание условий вакуума и последующую лиофильную сушку консервированных суспензий, это позволило визуализировать повреждения только в процессе образования и хранения в клатратах Хе. Визуализация повреждений мембран в процессе деконсервации с помощью данного способа была невозможной, так как лиофилизация нарушает процесс естественного выхода газов, характерный для периода деконсервации. В результате проведенного исследования показано, что клатраты Хе не разрушают цитоплазматические мембраны клеток на этапах консервации и хранения, а гибель определенного количества клеток, консервированных в клатратах Хе, может быть связана с декомпрессией образцов во время расконсервации.

Таким образом, механизмы действия клатратов и гипербарии Хе могут быть общими для изученных нуклеарных клеток, находящихся как в составе ткани, так и в виде изолированной культуры. При этом как ткань, так и адгезированные клетки демонстрируют большой консервирующий эффект клатратов Хе, который, может быть обусловлен специфической структурой ткани. Последняя может облегчать процесс деконсервации, снижая количество поврежденных клеток. Наряду с этим, все нуклеарные клетки или ткани, консервированные в гипербарии Хе, демонстрировали наименьший консервирующий эффект. Это может указывать

на иные механизмы консервации, которые, по-видимому, обусловлены не только ингибированием окислительных процессов.

Выводы:

- 1) Нуклеарные ФК, консервированные в клатратах Хе, демонстрируют значимо большую жизнеспособность по сравнению с клетками, консервированными в гипербарии Хе как в виде суспензий, так и в виде адгезированных культур.
- 2) Клетки, консервированные в клатратах Хе, демонстрируют сходную с ДМСО жизнеспособность при хранении в виде суспензий и лучшую жизнеспособность при хранении в виде адгезированных культур.
- 3) Клетки, консервированные в клатратах Хе, демонстрируют большую сохранность мембран в сравнении с клетками, консервированными в гипербарии Хе.
- 4) Функциональные характеристики клеток, консервированных в клатратах Хе, сохраняются лучше, чем клеток, консервированных в ДМСО.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Парадигма развития современной медицины, предусматривающая персонифицированный подход к лечению пациента, предполагает этап накопления живых биообъектов для последующего терапевтического применения. При этом эффективность такого применения прямо зависит от количества и качества накопленного биоматериала и его жизнеспособности.

Предметом проведенного научного исследования явилось изучение консервирующих свойств ксенона и его клатратов и через патогенетическое обоснование механизмов, лежащих в основе действия данного газа, разработка новой технологии консервации клеток и тканей.

В работе сравнивали гипербарическое и клатратное воздействие ксенона на суспензии эритроцитов. Впервые показано, что гипербарическая атмосфера более предпочтительна для консервации эритроцитов, чем воздействие клатратов ксенона. В экспериментах, проведенных для исследования сохранности эритроцитов, показано синергетическое действие сочетанного использования конвенционального гемоконсерванта ЦФДА-1 и гипербарической атмосферы ксенона. Это выражалось в лучшей сохранности основных исследуемых параметров эритроцитов. Так, показатели СОЭ были изменены в наименьшей степени, в сравнении с контрольной группой – ЦФДА-1, а наиболее важный показатель гемолиза, характеризующий пригодность клеток для гемотрансфузий и сохранность суспензии был почти в 6 раз ниже по сравнению с контролем. Наряду с этим, для клеток, консервированных с использованием ЦФДА-1+гипербария ксенона, показано наименьшее количество патологических форм эритроцитов – пойкилоцитов и дегмацитов. При этом по совокупности исследованных параметров, эритроциты, консервированные данным способом, демонстрировали сохранность, близкую к интактным, неконсервированным клеткам. В то же время эритроциты, консервированные в клатратах ксенона и в клатратах ксенона+ЦФДА-1, проявили ухудшение большинства исследованных параметров не только по отношению к контролю, но и другим опытными группам. Так, количество гемолизированных клеток, консервированных согласно данного способа, было сопоставимо с негативным контролем – эритроцитами, которые хранились в течение одинакового периода времени в отсутствие каких-либо консервантов. Только одна характеристика демонстрировала лучшие показатели в сравнении с большинством других опытных групп – это средняя осмотическая хрупкость. Прогнозируя результат осмотической стойкости, мы закономерно ожидали, что данная характеристика будет лучшей для группы гипербария ксенона+ЦФДА-1, однако группы консервации эритроцитов в клатратах ксенона также демонстрировали высокую устойчивость мембран эритроцитов в сравнении с контролем.

Полученные данные, с одной стороны, позволяют предположить меньшую практическую применимость способа консервации эритроцитов в клатратах ксенона, по крайней мере, для целей гемотрансфузии, а с другой - найденный феномен большей осмотической резистентности в этой группе по отношению к группе ЦФДА-1, свидетельствует о лучшей сохранности эластических и деформабильных свойств мембран этих клеток. Известно, так же, что не только количество гемолизированных эритроцитов в процессе консервации определяет практическую применимость метода, но и функциональная активность и жизнеспособность клеток после переливания. Так, в эритроцитах, консервированных в клатратах ксенона, наблюдалось отсутствие выраженного влияния процесса клатрирования на мембраны клеток. По всей видимости, повреждения клеток происходят или на этапе хранения или деконсервации – дегазации. Так как последний этап ассоциирован с выходом большого количества, растворенного в клатратах ксенона газа во время отогрева образцов и снижения растворимости газа. При гипербарическом воздействии, данный механизм также имеет место, однако в меньшей степени ввиду диспропорциональных количеств газа.

Таким образом, в результате проведенного исследования по изучению применимости гипербарии или клатратов ксенона для консервации суспензий эритроцитов в сравнении с другими способами хранения, впервые показано значительное преимущество гипербарического воздействия ксенона в сочетании со стандартным гемоконсервирующим раствором ЦФДА-1, который применяется в настоящее время в рутинной практике гемотрансфузиологии.

Противоположный результат был получен в экспериментах, проведенных с целью исследования сохранности кожных лоскутов, консервированных различными способами. Сравнивалось гипербарическое и клатратное воздействие ксенона на кожные лоскуты в сравнении со стандартным способом криоконсервации в ДМСО. Показано, что клатратные условия предпочтительнее для консервируемой ткани в сравнении с остальными способами хранения. Это подтверждалось лучшей сохранностью всех исследуемых параметров. Так, структурная целостность и функциональные параметры ткани, консервированной в клатратах, сохранились в большей степени, чем другими способами. Это нашло отражение как в большей сохранности организации и структуры коллагеновых и эластических волокон, так и лучшей функциональной активности клеток, составляющих ткань – кератиноцитов и фибробластов. Исследования жизнеспособности и функциональной активности, проведенные с помощью МТТ теста и метода оценки динамики экспансии и пролиферации клеток, показали лучшую сохранность исследуемых характеристик как в сравнении с группой консервации в гипербарии ксенона, так и в сравнении со стандартным методом криоконсервации в ДМСО. Исследование консервированных лоскутов на модели аутологичной трансплантации продемонстрировало не только преимущество способа клатратной консервации лоскутов по субъективным

морфометрическим параметрам (адгезия, цвет, эластичность), но и по результатам отсроченной трансплантации, в ходе которой оценивалось количество окончательно приживленных кожных лоскутов. Проведение последней было необходимым условием подтверждения достоверности и применимости способа для клинических целей, ввиду того, что в эксперименте были использованы полнослойные лоскуты, которые отличаются высоким порогом пострасплантационных отторжений. Процент приживлений данной разновидности ткани составляет в среднем 62,5 % [18]. При этом в группе, в которую входили кожные лоскуты, находившиеся в течение 7 суток в клатратах ксенона, количество окончательных приживлений составило 4 из 7 (57 %), в то время как в группе интактной кожи, эксплантированной, а затем немедленно трансплантированной в раневое ложе без какой-либо консервации, количество окончательно приживленных лоскутов было больше на один - 5 из 7 (71 %). В двух других опытных группах – с консервацией в гипербарии ксенона и ДМСО, данный показатель не превысил 2-х из 7 (28%). Таким образом, общая сохранность кожных лоскутов, консервированных в клатратах ксенона была значительно выше других исследуемых групп как по макро-, так и микроскопическим показателям жизнеспособности ткани. При этом по основным морфологическим показателям достоверных различий с контролем – лоскутами неконсервированной кожи обнаружено не было ($p \geq 0,05$).

Преимущество метода консервации в клатратах ксенона над гипербарической консервацией кожных лоскутов в ксеноне, а также предположение о сходстве механизмов, лежащих в основе действия клатратов и гипербарии Хе на ядродержащие клетки, явилось основанием для проведения дополнительного исследования - изучения сохранности морфофункциональных характеристик, изолированных нуклеарных митохондрий-содержащих клеток.

На дермальных фибробластоподобных клетках было показано значительное преимущество их клатратного хранения клеток над гипербарической консервацией в ксеноне. Наряду с этим, выявлено синергетическое действие клатратов ксенона и эффекта адгезированных клеток во время консервации. Жизнеспособность адгезированных клеток была более чем на 20 % выше, чем суспензионных культур, консервированных как в 10% ДМСО при -84°C , так и в клатратах ксенона ($p \leq 0,05$). Показатели морфофункциональной активности также демонстрировали лучшие характеристики для клеток, консервированных в клатратах ксенона. Так, клоногенная и синтетическая активность были достоверно выше, чем клеток, консервированных в ДМСО, а при последующем субкультивировании консервированных в клатратах ксенона клеток, количество патологических форм было меньшим, а адгезия на пластике более высокой. Исследованные характеристики показали сходство с контрольной группой, в которой клетки не подвергались какой-либо консервации. Клетки,

консервированные в ДМСО, наоборот, демонстрировали меньшую адгезивную и локомоторную активность, вместе с увеличением числа дегенеративных форм во время субкультивирования.

Таким образом, данные, полученные в экспериментах с фибробластоподобными клетками и кожными лоскутами, впервые выявили, что клатраты ксенона мало влияют на морфофункциональную и пролиферативную активность зрелых ядродержащих клеток и тканей, как в сравнении со стандартными техниками хранения, так и по сравнению с гипербарией Хе.

В экспериментах на эритроцитах показано, что при консервации в гипербарии ксенона в меньшей степени повреждаются клеточные мембраны. Наоборот, на данном объекте, клатраты ксенона повреждали их в большей степени, а на этапе клатратообразования эти события не развивались, что было продемонстрировано, как на суспензии эритроцитов, так и на взвеси фибробластоподобных клеток в экспериментах со сканирующей электронной микроскопией. Означенное дает основания предполагать, что разрушение клеток, наблюдаемое в клатратах ксенона, были характерны для этапов хранения или деконсервации – дегазации. Несмотря на то, что гипербария ксенона также предполагает этап дегазации, последняя является менее губительной для консервируемой суспензии, чем для клеток, консервированных в клатратах ксенона. Это связано с более высоким давлением газа, которое используется для получения клатратов в консервируемых суспензиях клеток в сравнении с гипербарией ксенона. Так, чем выше атмосферное давление газа, тем больше его парциальное давление, которое определяет степень растворимости в клетках и межклеточном пространстве.

Таким образом, там и когда гипербарическое воздействие ксенона может найти применение и быть обосновано для консервации безъядерных клеток (эритроцитов), оно не может быть использовано для консервации ядро- и митохондрий-содержащих клеток (фибробластоподобные клетки). Так, все проведенные эксперименты по оценке жизнеспособности и функциональных характеристик тканей или клеток, находящихся в их составе, демонстрируют преимущество клатратов ксенона с целью консервации зрелых ядродержащих клеток. Поэтому в нуклеарных и безъядерных клетках могут принимать участие различные механизмы консервирующего, протективного или патогенного действия как клатратов ксенона, так и гипербарической атмосферы данного газа.

Например, для надежного консервирования эритроцитов достаточно исключить образование свободных радикалов путем инактивации механизма окисления гемоглобина, для которого может быть использована гипербария ксенона. Однако этого будет недостаточно для нуклеарных клеток, ввиду необходимости остановки метаболизма, который, по-видимому, продолжается и при низких температурах с участием ДМСО или при неполном клатрировании свободной вне- или внутриклеточной воды при +4 °С. Гипербарическое воздействие ксенона,

при сохраняющемся метаболизме, очевидно, будет приводить к разрушительным последствиям по аноксическому механизму. Поэтому инактивация воды при консервации и хранении нуклеарных клеток в клатратах ксенона может быть ключевым звеном в профилактике клеточных повреждений.

Таким образом, проведенное исследование предполагало изучение воздействия различных условий ксенона на нескольких видах биообъектов (эритроциты, фибробластоподобные клетки, кожные лоскуты) и, следовательно, разных уровнях организации – клеточном и тканевом. Основные механизмы и эффекты действия как гипербарии, так и клатратов ксенона можно представить исходя из данных, полученных из собственных исследований (рисунок 42). Ткань, консервированная данным способом, демонстрировала большую целостность в сравнении с другими методами, даже после процедуры декомпрессии. Очевидно, что консервирующему действию на тканевом и органно-тканевом уровне предшествует клеточный уровень организации, на котором имеет место улучшенная сохранность клеток, которая, в случае, с нуклеарными клетками более выражена в клатратах ксенона, чем в гипербарии, а в случае с безъядерными (эритроцитами) - наоборот. С другой стороны, очевидным механизмом защиты от активных форм кислорода будет замещение молекулярного кислорода на инертный газ, а также предположение о клатратном анабиозе, основанном на инактивации молекул воды.

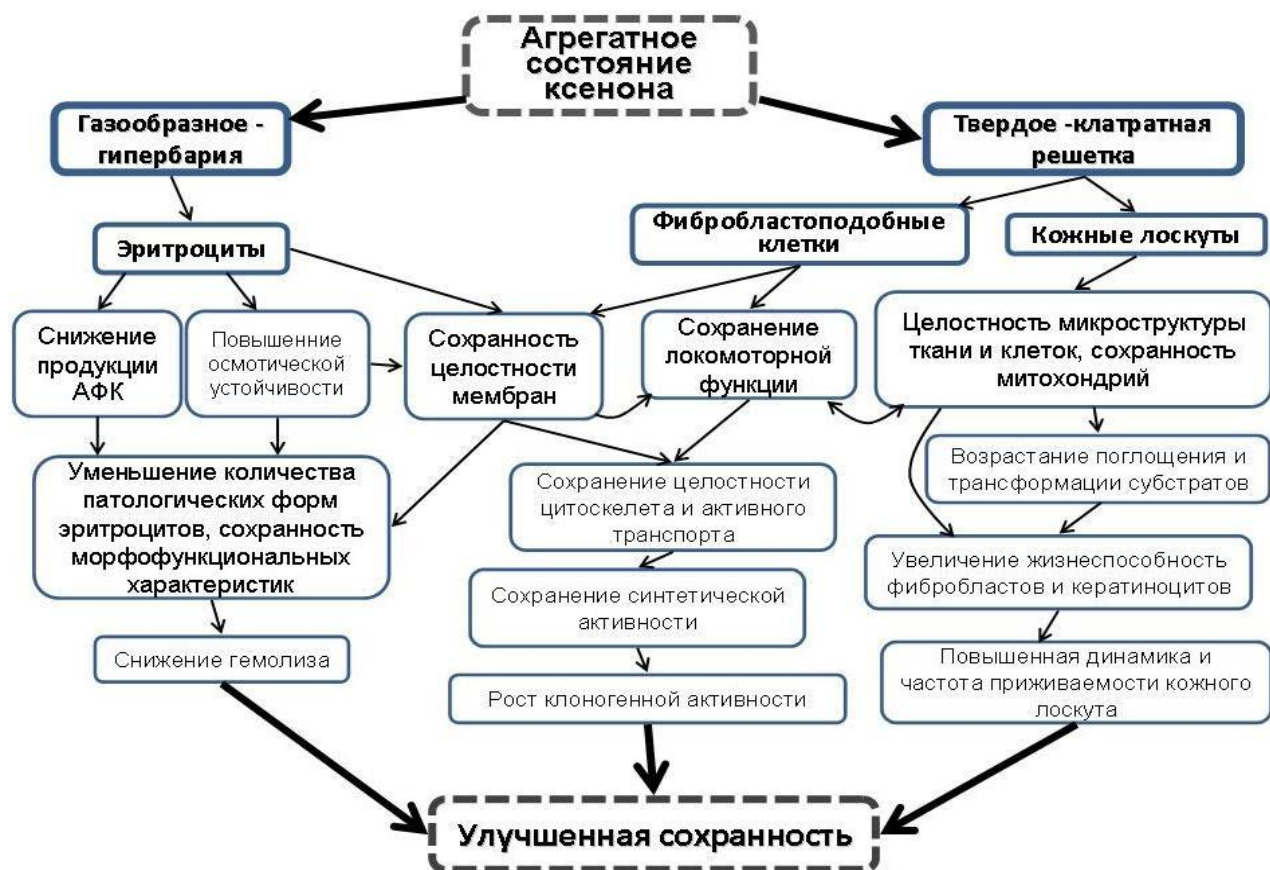


Рисунок 42 - Механизмы действия ксенона на различные виды консервируемых биообъектов

С целью синтеза полученных результатов, была предпринята попытка обоснования гипотезы клатратного анабиоза и консервирующего действия гипербарической атмосферы ксенона. Предложено обоснование предположения об остановке метаболизма клатратами ксенона в нуклеарных клетках и описаны механизмы, лежащие в основе как сходного, так и различного консервирующего действия гипербарии Хе на разные типы клеток. На рисунке 43 представлена обобщенная патофизиологическая гипотеза влияния различных состояний ксенона (клатратов или гипербарии по сравнению с O_2).

На схеме указаны процессы генерации энергии в клетке общие как для нуклеарных и безъядерных клеток – гликолиз (А), так и только для нуклеарных митохондрий-содержащих клеток (D) (фибробластоподобные клетки). Гликолиз, проходящий под действием различных условий (O_2 , клатраты Хе, гипербария Хе) реализуется по-разному. Например, в нуклеарных клетках при аэробном гликолизе конечным продуктом окисления глюкозы является АцКоА, который далее используется в ЦТК, после чего происходит генерация 34 молекул АТФ в процессе окислительного фосфорилирования (D). АТФ гидролизуеться при наличии свободной воды и полученная энергия (Q) используется для клеточного метаболизма(E).

При воздействии на клетки гипербарической атмосферы ксенона, более тяжелый газ заменяет легкий O_2 , путем равновесной абсорбции и гликолиз будет протекать по анаэробному механизму, результатом которого является продукция лактата вместо АцКоА, и, как следствие - блокирование окислительного фосфорилирования. Наряду с этим, блокирование ЭТЦ (D) происходит на уровне митохондрий, так как последним необходим кислород для нормального протекания окислительных реакций. Следствием означенных процессов будет как недостаток продукции АТФ, так и «закисление» клеток, так как из пирувата в анаэробных условиях образуется только 2 молекулы АТФ и лактат. Тем временем энергозависимые процессы синтеза веществ в клетках будут протекать с прежними затратами энергии. Поэтому, с одной стороны, возникнет ситуация несоответствия продукции энергии ее потреблению, а с другой стороны, метаболический ацидоз. Очевидно, что в таких условиях все системы клеток будут сильно повреждены. Положительным моментом способно выступить блокирование каскада реакций, ведущих к образованию активных форм кислорода (G) и приводящих к атаке свободными радикалами всех компонентов клетки, например, клеточной мембраны посредством перекисного окисления липидов (F) (ПОЛ). С участием гипербарии ксенона данный процесс будет блокирован сразу на двух уровнях – продукция активных форм кислорода с ЭТЦ митохондрий и O_2 -зависимый механизм образования липоперекисей из свободного липид-радикала (F). Таким образом, совокупность реакций с участием гипербарической атмосферы Хе демонстрирует неотвратимость нарушений, которые будут возникать в ядро- и митохондрий-содержащих клетках.

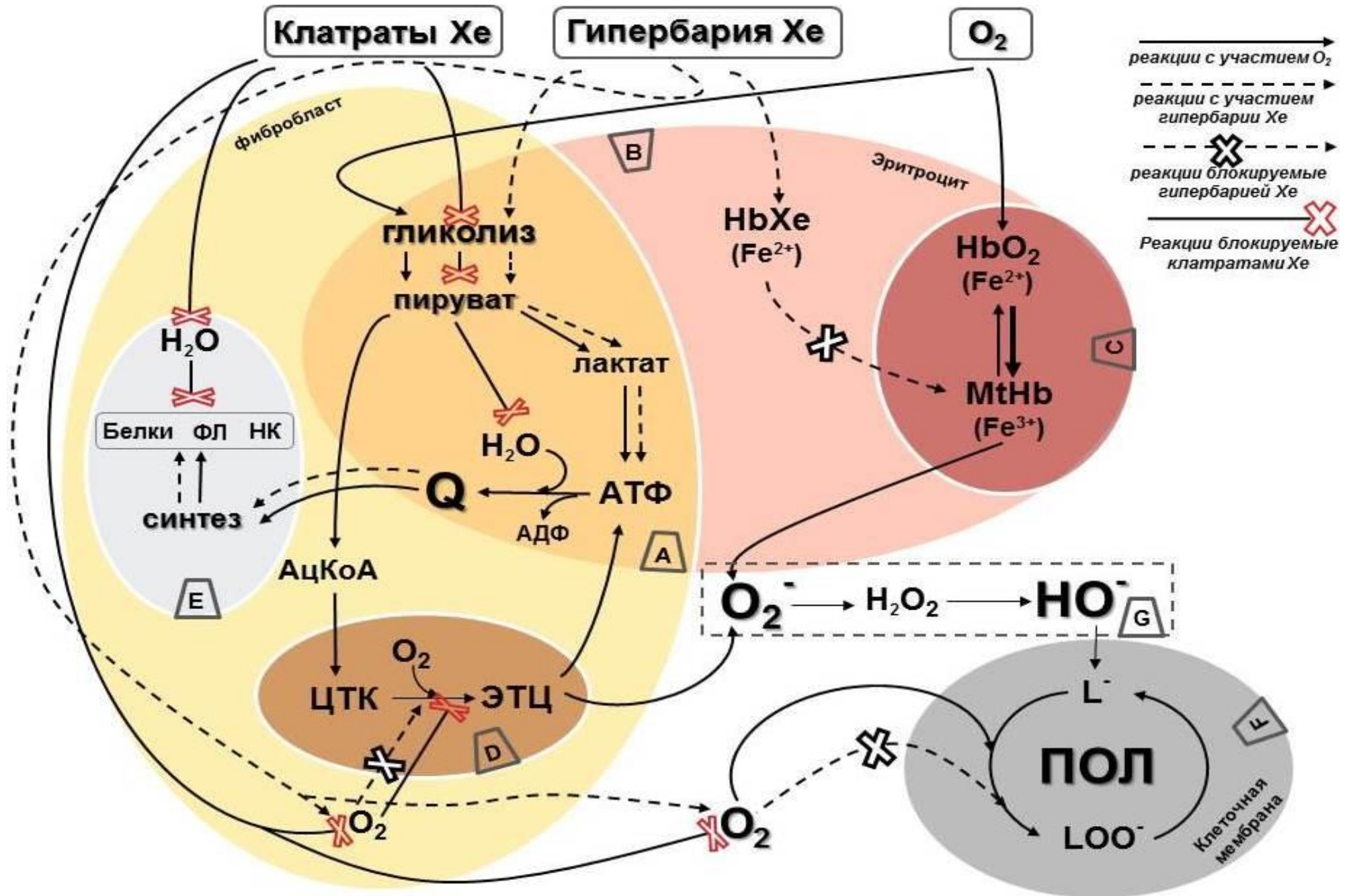


Рисунок 43 - Гипотеза патогенетического действия ксенона и клатратов на разные типы клеток и метаболические процессы в них по сравнению с O_2 -зависимым метаболизмом.

А – процесс гликолиза, характерный для всех типов клеток. В – Блокирование реакции образования метгемоглобина в Эр путем гипербарии Хе. С – Спонтанное окисление гемоглобина молекулярным кислородом и реакция образования метгемоглобина в Эр (1-5 % клеток в норме). D – Митохондриальные процессы цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и последующего окислительного фосфорилирования на электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), характерные для нуклеарных клеток (в эритроцитах не протекают). E – Процессы синтеза белков, фосфолипидов и нуклеиновых кислот, характерные для нуклеарных клеток. F – Перекисное окисление липидов, характерное для всех типов клеток. G – Процессы формирования активных форм кислорода (АФК), окисляющих мембраны, белки, ДНК и РНК, характерные для всех клеток. Сокращения: Q – энергия.

Противоположный эффект гипербарической консервации безъядерных эритроцитов (В) может быть объяснен с позиций отсутствия части реакционных компартментов характерных для нуклеарных клеток - митохондрий (D) и синтетического аппарата (E). Процесс генерации энергии в эритроцитах, в основном, обусловлен анаэробным гликолизом (А) и во всех случаях протекает с образованием лактата. Пируватдегидрогеназный комплекс превращения пирувата в АцКоА отсутствует. Затраты энергии в эритроцитах намного меньше чем в митохондриаль-содержащих клетках, а ее продукция сбалансирована с потреблением, даже в анаэробных условиях, так как основной энергетический комплекс (гликолиз) в данных условиях только усиливается. Проблемой тут может быть избыточная утилизация глюкозы и продукция лактата. Однако, они могут быть скорректированы добавлением консерванта, содержащего достаточное количество сахара и обладающего хорошими буферными свойствами. Синергетическое действие гипербарии ксенона с ЦФДА-1 подтверждает данное предположение. Тем самым, гипербарическая консервация в ксеноне, в большей степени выгодна для консервации эритроцитов как в сравнении с нуклеарными клетками, консервированными в гипербарии, так и по сравнению с эритроцитами, консервированными в клатратах ксенона. Последнее обстоятельство, может быть обусловлено меньшей растворимостью ксенона в гипербарических условиях, чем клатратных и облегченным выходом газа из клеток при декомпрессии. Механизмы протективного действия гипербарии ксенона для эритроцитов так же находят объяснение в блокировании реакции образования метгемоглобина из оксигенированного гемоглобина. В норме данная реакция протекает в 1-5 % эритроцитов [111] и приводит к образованию активных форм кислорода, участвующих в перекисном окислении липидов биологических мембран и окислении цитоскелета эритроцитов по замкнутому циклу с участием

O₂. Замещение O₂ на ксенон способно остановить ПОЛ-цикл как на этапе образования липоперекиси из липид-радикала, так и на этапе окисления Hb в метгемоглобин. Таким образом, означенные закономерности обуславливают выраженное преимущество гипербарической атмосферы Хе в качестве консервирующей среды для хранения Эр по сравнению с нормоксическими условиями.

Клатратный механизм консервации, являясь наиболее разрушительным на этапе дегазации, в большей степени может подходить нуклеарным и митохондрией-содержащим клеткам. Означенное положение согласуется с практическими данными, полученными в экспериментах по консервации фибробластоподобных клеток и тканей в клатратах ксенона. Протективный эффект клатратов ксенона в данном случае может быть обусловлен иммобилизацией воды и, следовательно, исключением большинства метаболических процессов в клетках. Например, гликолиз будет блокирован по причине остановки движения субстратов в клатрированной воде, требуемых для протекания каскада реакций, далее будет блокирован механизм образования АцКоА (А) и, следовательно, остановка ЭТЦ (D), генерирующей основное количество молекул АТФ. Для реализации этого механизма не требуется сверхнизких температур.

Таким образом, там и когда в гипербарии Хе блокируется только механизм окислительного фосфорилирования субстратов с участием O₂, в клатратах Хе будут блокированы все реакции генерации энергии. Однако, в отличие от гипербарии Хе синтез веществ (Е) в данных условиях, также будет остановлен, так как доставка и процесс движения ионов основных неорганических субстратов, необходимых для синтеза белков, фосфолипидов и нуклеиновых кислот (NO₂⁻, CO₃²⁻, H₂PO₄⁻) будут невозможны в клатрированной воде (Е). Следовательно, процессы потребления энергии в клетке будут уравновешены с процессами ее генерации, основной метаболизм останавливается, а клетки перейдут в состояние анабиоза, обусловленного воздействием клатратов Хе. Механизмы генерации активных форм кислорода и последующее перекисное окисление липидов будут блокированы на митохондриальном и мембранном уровнях. Таким образом, предложенная гипотеза консервирующего действия предполагает лучшее влияние на сохранность ядро- и митохондрией-содержащих клеток в клатратных условиях хранения.

Выводы

1. Гипербарическое воздействие ксенона (3 атм.) в сочетании со стандартным гемоконсервантом ЦФДА-1 при +4 °С обладает выраженным синергетическим эффектом на консервируемые эритроциты, выражающемся в снижении показателей гемолиза и появления патологических форм клеток, а также сохранением первичной структуры мембран.
2. Хранение кожных лоскутов с использованием клатратов ксенона (6 атм.) при +4 °С оказывает выраженный консервирующий эффект как по сравнению с гипербарическим воздействием ксенона (3 атм., +4 °С), так и со стандартным способом криоконсервации клеток и тканей в растворе 10% ДМСО при -84 °С, что находит подтверждение в лучшей сохранности микро- и макроскопической структуры ткани, показателях жизнеспособности клеток (МТТ-тест, экспансия фибробластов), а также лучшей приживаемости кожных лоскутов.
3. Культивируемые фибробластоподобные клетки, консервированные в клатратах ксенона, более сохранны по сравнению с гипербарией ксенона при +4 °С, а также по сравнению со стандартным методом криоконсервации в 10% ДМСО при -84 °С в условиях краткосрочного хранения (2 суток).
4. Клатраты ксенона обладают выраженным консервирующим эффектом на фибробластоподобные клетки в условиях глубокой гипотермии, находящиеся как в суспензии или адгезированном на пластике состоянии, так и в составе ткани кожи.
5. Механизмы, лежащие в основе протективного воздействия клатратов и гипербарии ксенона во время консервации различны при хранении фибробластоподобных клеток и эритроцитов, что обусловлено различием метаболизма в этих клетках. В эритроцитах ведущим является аноксический механизм консервации, а в фибробластоподобных клетках иммобилизация воды в клатратную решетку.

Практические рекомендации

1. Для консервации изолированных Эр рекомендуется использовать гипербарическую атмосферу Хе в сочетании со стандартным гемоконсервирующим раствором ЦФДА-1 при +4 °С. При невозможности использования раствора ЦФДА-1 возможно заменить его на раствор, основой которого является буферный раствор в сочетании с декстрозой.
2. Для консервации кожных лоскутов с целью большей сохранности тканей рекомендуется использовать клатраты Хе в качестве основного консервирующего агента при +4 °С. При этом ограждающей средой, в которой происходит клатрирование-консервирование ткани, рекомендуется использовать безсывороточные среды. В случае отсутствия данных сред возможно использование различных буферных растворов или физиологического раствора NaCl.
3. Для создания гипербарических или клатратных условий хранения рекомендуется использовать устройства, выполненные по типу герметичных барокамер, с возможностью регистрации уровня давления газов внутри контейнера. При этом для создания условий гипербарической атмосферы Хе рекомендуется не превышать абсолютное давление Хе в контейнере более чем на 3 атм. Клатрирование биообъектов может быть получено путем создания избыточного давления Хе от 4 до 7 атм. в диапазоне температур от 0 до +4 °С.

Список литературы

1. Абдулкадыров К. М. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови / К. М. Абдулкадыров, Н. А. Романенко, Н. Н. Старков // Вопросы онкологии. - 2000. - № 46. - С. 513-520.
2. Белослудов В. П. Теоретические модели клатратообразования / В. П. Белослудов, Ю. А. Дядин, М. Ю. Лаврентьев. — Новосибирск, 1991. — 128с.
3. Белоус А. М. Замораживание и криопротекция. Биохимия мембран. Книга 3 / А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов. - М.: Высш. шк., 1987. - 80 с.
4. Белоус А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко — Киев, «Наукова думка», 1994. — 432 с.
5. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций / М. Б. Аскаров, О. В. Баранова, Л. В. Башкина [и др.]; под ред. В. И. Шумакова, Н. А. Онищенко — М.: Лавр, 2009. — 307 с.
6. Буров Н. Е. Применение ксенона в медицине / Н. Е. Буров // Ксенон и инертные газы в медицине. — М., 2008. — С. 10—28.
7. Васильев А. В. «ДОРОЖНАЯ КАРТА» РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ / А. В. Васильев, М. Батин // Гены и клетки. — 2010. - Вып. 2, т. 5. - С. 89-90.
8. Влияние ксенона на клетки и рецепторы / И. А. Хлусов, С. А. Наумов, С. М. Вовк [и др.] // Вестник Российской Академии медицинских наук. - 2003. - №: 9. - С. 32-37. - Библиогр.: 58 назв.
9. Волков В. Ю. Механизмы криповреждения и криозащиты биологических объектов / В. Ю. Волков. — Харьков: Наукова Думка, 1984 — 199 с.
10. Волков В. Я. Образование клатратов ксенона как метод иммобилизации молекул воды в клеточных суспензиях / В. Я. Волков, В. В. Родин, Ф. Ш. Исангалин // Экспериментальный анабиоз: тезисы докл. 2-й Всесоюз.конф. по анабиозу. - Рига, 1984. - С.51-52.
11. Голдовский А.М. Анабиоз и его практическое значение / А. М. Голдовский — Л.: Наука, 1986. — 169 с.
12. Довгуша В. В. Возможный и молекулярный механизм наркотического действия инертных газов / В. В. Довгуша, М. В. Фок, Г. А. Зарицкая // Биофизика. — 2005. — Т. 50, вып. 5. — С. 903— 908.

13. Довгуша В. В. Физические механизмы физиологического и биологического действия инертных газов на организм / В. В. Довгуша, Л. В. Довгуша. – СПб: Пресс-Сервис, 2012. – 228 с.
14. Донорская кровь и ее компоненты: характеристики и контроль качества. Кριοконсервированные эритроциты: стандарт организации № 8. – М.: РАТ, 2005. – 4 с.
15. Дядин Ю. А. Соединения включения / Ю. А. Дядин, К. А. Удачин, И. В. Бондарюк. — Новосибирск: НГУ, 1988. – 92 с.
16. Дядин Ю. А. Супрамолекулярная химия. Клатратные соединения / Ю. А. Дядин // Соросовск. образоват. журн. — 1998. — № 2. — С. 79—88.
17. Заграничнов В. Д. Регенеративная медицина. Достижения и развитие / В. Д. Заграничнов, Н. А. Киреев // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013. - Вып. 2, т. 3. – С. 469.
18. Задорожный А. А. Динамика кровотока в аутотрансплантатах кожи разных участков тела у крыс по данным лазерной доплеровской флоуметрии / А. А. Задорожный, С. И. Катаев, С. Ю. Штрыголь // Методология флоуметрии. – 2001. - Вып. 5. - С. 179-196.
19. Исследование гидратов ксенона в водных растворах белков методом ЯМР-релаксации / В. В. Родин, А. Н. Архангельский, Ф. Ш. Исангалин [и др.] // Магнитный резонанс в биологии и медицине: тезисы докл. 2-го Всесоюз.симпоз. - М.: Черноголовка, 1981. - С.115-116.
20. Истомин В. А. Газовые гидраты в природных условиях / В. А. Истомин, В. С. Якушев. - М.: Недра, 1992. - 236 с.: ил. Библиогр.:с.231-235.
21. Кριοконсервация клеточных культур млекопитающих с использованием ксенона / А. Ю. Пульвер, А. В. Целиковский, Н. А. Пульвер [и др.] // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: материалы международной научно практической конференции. – Сыктывкар, 2014. - С. 226-233.
22. Ломако В. В Эритроциты периферической крови при разных вариантах гипотермии гомеотермного организма / В. В. Ломако, И. Ф. Коваленко, А. В. Шило // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 398-409.
23. Математическая модель эритроцитов для расчета их упругих свойств и морфологии [Электронный ресурс] / Ю. С. Нагорнов, В. В. Гноевых, А. Ю. Смирнова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8474>.

24. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство/ под ред. Коржевского Д. Э. - СПб.: СпецЛит, 2013. - 127с.
25. Онищенко Н. А. Консервация органов и тканей / Н. А. Онищенко // Трансплантология: руководство / под ред. В.И. Шумакова. – М.: 1995. — С. 77.
26. Панченков Т. П. Определение оседания эритроцитов при помощи микрокапилляра / Т. П. Панченков // Врач. дело. – 1924. – № 16–17. – С. 695–697.
27. Пат. № 2268590 Российская Федерация, МПК A01N 1/02. Способ криоконсервации органов и тканей *in situ* / Щербаков П. В., Тельпухов В. И., Николаев А. В.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Моск. Мед. Акад. - № 2004117804/15; заявл. 15.06.2004; опубл. 27.01.2006, Бюл. № 3 (II ч.). – 3 с.: ил.
28. Пат. US20050005611 A1. Highly-efficient freezing apparatus and highly-efficient freezing method / Owada N. - PCT/JP2002/011430; заявл. 01.11.2002; опубл. 13.01.2005.
29. Перспективы и первые результаты аутотрансплантации ткани яичника / Н. Н. Рухляда, Н. О. Мотовилова, А. Ю. Грязнов [и др.] // Проблемы репродукции. – 2013. - № 2. - С. 48-51.
30. Пожарский А. Ф. Супрамолекулярная химия / А. Ф. Пожарский // Соросовск. образоват. журн. — 1997. — № 9. — С. 32—47.
31. Получение клатратов ксенона в воде и исследование их свойств импульсным методом ЯМР / В. В. Родин, А. Н. Архангельский, Ф. Ш. Исангалин [и др.] // Криобиол. и криомед. - 1984. - Вып. 4. - С. 8-11.
32. Потапенко А. Я. Осмотическая устойчивость эритроцитов: учеб. пособие / А. Я. Потапенко, А. А. Кягова, А. М. Тихомиров // ГОУ ВПО РГМУ, 2006. – 16 с.
33. Потапов А. В. Влияние жирности и температуры жидкости на растворимость криптона. Результаты экспериментального исследования / А. В. Потапов, И. А. Архаров // Химическое и нефтегазовое машиностроение. - 2010. - №8. - С. 27- 28.
34. Потапов А. В. Исследование абсорбции ксенона водно- эмульсионными растворами в зависимости от их жирности / А. В. Потапов, И. А. Архаров // Вестник МГТУ им. Н.Э.Баумана. Машиностроение. - 2009. - №3. - С. 96-100.
35. Потапов А. В. Исследование равновесной абсорбции инертных газов в водно-эмульсионных растворах в зависимости от их жирности / А. В. Потапов, И. А. Архаров, А. А. Александров // Химическое и нефтегазовое машиностроение. - 2009. - № 10. - С. 26.

36. Потапов А. В. Исследование равновесной абсорбции ксенона и криптона водно-эмульсионными растворами в зависимости от жирности и температуры растворителя: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 05.04.03 / А. В. Потапов. – М., 2011. – 153 с.
37. Причины повреждения клеток при замораживании-оттаивании и криоконсервации - Access mode: http://biomedphys.univer.kharkov.ua/biokaf/images/kriobiofizika_1-3.pdf.
38. Пушкарь Н. С. Криопротекторы / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус. - Киев: Наукова. думка, 1978. - 204 с.
39. Родин В. В. "Замораживание" бактериальных суспензий при положительных температурах клатратами ксенона. Данные метода ЯМР / В. В. Родин, В. Я. Волков, Ф. Ш. Исангалин // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов: тезисы докл. 2-й Всесоюз.конф. - Харьков, 1984. - Т. 1. - С.199.
40. Родин В. В. Влияние ксенона на систему ДНК связанная вода по данным метода импульсного ЯМР / В. В. Родин, И. А. Новиков, В. Я. Волков // Криобиология. – 1989. - N4. - С.35-38.
41. Родин В. В. Состояние воды в суспензиях клеток E.coli с клатратами ксенона по данным ЯМР-релаксации / В. В. Родин, Ф. Ш. Исангалин, В. Я. Волков // Всесоюз. биофиз. съезд: тезисы докл. – М, 1982. - Т.2. - С.9.
42. Родин В. В. Структура водных растворов белков в присутствии клатратов ксенона / В. В. Родин, Ф. Ш. Исангалин, В. Я. Волков // Криобиология и криомедицина. -1984. - Вып.14. - С. 3-7.
43. Родин В.В. Взаимодействие клатратообразователей с биологическими объектами / В. В. Родин // Сб. трудов конференции Казанского института биологии: 1985. - Казань: Деп.ВИНИТИ. - 1985. N 4029-85. - С.1-5.
44. Родин В.В. Исследование методом ЯМР бактериальных суспензий после воздействия инертного газа. Режим декомпрессии / В. В. Родин, В. Я. Волков // М.: Деп. ВНИИСЭНТИ. - 07.07.87, № 393 МБ. - С. 1-13.
45. Родин В.В. Исследование методом ЯМР системы биополимер-вода в присутствии клатратов ксенона / В. В. Родин, Ф. Ш. Исангалин, В. Я. Волков // 5-я Всесоюз. конф. по спектр, биополимеров: тезисы докл. - Харьков: ИРЭ, 1984. - С. 187-188.
46. Родин В.В. Образование клатратов ксенона в суспензиях клеток E.coli по данным метода "парамагнитного допинга" / В. В. Родин, В. Я. Волков, Ф. Ш. Исангалин // Биофизика.- 1986. - Т. 31, №2. - С.274-277.

47. Родин В.В. Структурирование водных растворов белков клатратами ксенона / В. В. Родин, Ф. Ш. Исангалин, В. Я. Волков // 1-й Всесоюз биофизич. съезд: тезисы докл. - М., 1982. - Т.1. - С.86.
48. Санников А. Г. Закономерности изменения уровня аденозинтрифосфата в эритроцитах в процессе их упругой деформации: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.17 / А. Г. Санников. – Тюмень, 1999. – 24 с.
49. Смольников В. П. Новая молекулярная теория наркоза Л. Полинга / В. П. Смольников // Вестн. хир. — 1962. — № 3. — С. 78—81.
50. Современные подходы к консервированию лейкоцитов / А. Н. Худяков, О. О. Зайцева, Т. В. Полежаева [и др.] // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: материалы международной научно практической конференции. – Сыктывкар, 2014. С. 238-241.
51. Состояние системы ДНК-связанная вода-ксенон при отрицательных температурах: ЯМР-данные / В. В. Родин, И. А. Новиков, В. Г. Рыжов [и др.] // 5-я Всесоюз. конф. по спектр, биополимеров: тезисы докл. – Харьков.: ИРЭ, 1984. - С.188-189.
52. Тельпухов В. И. Клатратная криоконсервация / В. И. Тельпухов, П. В. Щербаков // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. - 2012. - Т. 15, № 3 (42). – С. 77-80.
53. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни. – пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.: ил., [24] с. цв. вкл.: с. 220-221.
54. Чуйко В. А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО / В. А. Чуйко // Криобиология. – 1989. – №1. – С. 3-10.
55. Шамов С. А Ксенонотерапия опийной и алкогольной зависимости. / С. А. Шамов, Б. Д. Цыганов, Ю. А. Шуляк. — М., 2009. – 27 с.
56. Шраго М. И. Биологические антифризы и криопротекторы / М. И. Шраго // Криобиология и криомедицина. - 1977. - Вып. 3. - С. 81-83.
57. Штиллер В. Уравнение Аррениуса и неравновесная кинетика / В. Штиллер. — М.: Мир, 2000. — 176 с.
58. Шумаков В. И. Консервация органов / В. И. Шумаков, Е. Ш. Штенгольд, Н. А. Онищенко; ред. Б. В. Петровского. – М.: Медицина, 1975. - 252 с.: ил. - Список лит. : с. 239-250.
59. A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation / Z. Changjun, P. Wenpei, D. Li [et al.] // Cryobiology. – 2014. - № 69. - P. 119–127.

60. A theoretically optimized method for cord blood stem cell cryopreservation / E. Woods, J. Liu, K. Pollok [et al.] // *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*. - 2001. - № 12. - P. 341-350.
61. An AFM approach of RBC micro and nanoscale topographic features during storage / K. Santacruz-Gomez, E. Silva-Campa, S. Álvarez-García [et al.] // *International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*. – 2014. – Vol.8, № 8. – P. 410–413.
62. An efficient large-scale thawing procedure for cord blood cells destined for selection and ex vivo expansion of CD34+ cells / P. Dushez, B. Dazey, L. Douay [et al.] // *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*. - 2003. - № 12. - P. 587-589.
63. Antifreeze proteins in polar sea ice diatoms: diversity and gene expression in the genus *Fragilariopsis* / M. Bayer-Giraldi, C. Uhlig, U. John [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 12, Iss. 4. – P. 1041–1052.
64. Applegate L. A. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells / L. A. Applegate, P. Luscher, R. M. Tyrrell // *Cancer Res*. - 1991. — Vol. 51. - P.974-978.
65. Armitage W. J. Permeability of human platelets to glycerol / W. J. Armitage // *J. Cell. Physiol*. – 1986. - № 128. - P. 121–126.
66. Armitage W. J. Preservation of Human Cornea / W. J. Armitage // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2011. - Vol. 38, № 2. - P. 143–147.
67. Assessment of organ culture for the conservation of human skin allografts / A. Hautier, F. Sabatier, P. Stellmann [et al.] // *Cell Tissue Banking*. – 2007. – Vol. 9, Iss. 1. – P. 19–29.
68. Bendayan M. The intracellular capillary endothelium in microcirculation / M. Bendayan, E. Sanborn, E. Rasio. – New York: Plenum publ. corp., 1978. – 169 p.
69. Best B. P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research* / B. P. Best – 2015. – Vol. 18, № 5. – P. 422-436.
70. BEST B. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryonics [Electronic resource] / B. Best. - Access mode: <http://www.benbest.com/cryonics/viable.html>.
71. Biophysical changes induced by xenon on phospholipid bilayers / R. D. Booker, A. K. Sum // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. - 2013 - Vol. 1828, Iss. 5. - P. 1347-1356.
72. Bioprinting technology and its applications / Y. J. Seol, H. W. Kang, S. J. Lee [et al.] // *European Journal of Cardi-thoracic Surgery*. – 2014. – Vol. 46, № 3. – P. 342-348.

73. Bruick R. K. Transcription. Oxygen sensing gets a second wind / R. K. Bruick, S. L. McKnight // *Science*. - 2002. - Vol. 295. - P. 807-808.
74. Bruick R. K. Transcription. Oxygen sensing gets a second wind / R. K. Bruick, S. L. McKnight // *Science*. - 2002. - Vol. 295. - P.807-808.
75. Brune B. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis / B. Brune, J. Zhou, A. von Knethen // *Kidney. Int. Suppl.* - 2003. - Vol. 84. - P. 22-24.
76. Buffett B. Global inventory of methane clathrate: sensitivity to changes in the deep ocean / B. Buffett, D. Archer // *Earth and Planetary Science Letters*. – 2004. – Vol. 227, Iss. 3-4. – P. 185–199.
77. Cardiac Mitochondria I Membrane Stability after Deep Hypothermia using a Xenon Clathrate Cryostasis Protocol - an Electron Microscopy Study / S. Sheleg, H. Hixon [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2008. – Vol. 1, № 5. - P. 440-447.
78. Cranial bone regeneration after cranioplasty using cryopreserved autogenous bone by a programmed freezer with a magnetic field in rats / M. Kaku, H. Koseki H, S. Kojima [et al.] // *CryoLetters*. – 2014. - Vol. 35, № 6. – P. 451-461.
79. Cranial suture-like gap and bone regeneration after transplantation of cryopreserved MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field in rats / S. I. Kojima, M. Kaku, T. Kawata [et al] // *Cryobiology*. – 2015. - Vol. 70, Iss. 3. P. 262-268.
80. Cryopreservation of articular cartilage / A. Abazari, N, M. Jomha, J. A. Elliott [et al.] // *Cryobiology*. – 2013. Vol. 66, Iss. 3. – P. 201-209.
81. Cryopreservation of human embryonic stem cells by a programmed freezer with an oscillating magnetic field / P. Y. Lin, Y. C. Yang, S. H. Hung [et al] // *Cryobiology*. – 2013. – Vol. 66, Iss 3. P. 256-260.
82. Cryopreservation of osteoblasts by use of a programmed freezer with a magnetic field. H. Koseki, M. Kaku, T. Kawata [et al.] // *CryoLetters*. – 2013. – Vol. 34, № 1. – P. 10-19.
83. Cryopreservation of periodontal ligament cells with magnetic field for tooth banking / M. Kaku, H. Kamada, T. Kawata [et al]. // *Cryobiology*. – 2010. Vol. 61, Iss 1. – P. 73-78.
84. Cryopreservation of rat MSCs by use of a programmed freezer with magnetic field / S. Kojima, M. Kaku, T. Kawata [et al.] // *Cryobiology*. – 2013. – Vol. 67, Iss 3. – P. 258-263.
85. Cryopreservation strategy for tissue engineering constructs consisting of human mesenchymal stem cells and hydrogel biomaterials / Y. Wu, F. Wen, S. S. Gouk [et al.] // *CryoLetters*. – 2015. – Vol 36, № 5. P. 325-335.

86. Deterioration of red blood cell mechanical properties is reduced in anaerobic storage / J. M. Burns, T. Yoshida, L. J. Dumont [et al.] // *Blood Transfusion*. – 2015. - № 27. – P. - 80-88.
87. Developmental Competence of Vitrified-Warmed Bovine Oocytes at the Germinal-Vesicle Stage is Improved by Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators during In Vitro Maturation [Electronic resource] / K. Ezoe, A. Yabuuchi, T. Tani [et al.] // *PLoS One*. - 2015 – Access mode: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126801>.
88. Diffusive nature of xenon anesthetic changes properties of a lipid bilayer: molecular dynamics simulations / E. Yamamoto, T. Akimoto, H. Shimizu [et al.] // *The Journal of Chemical Physics*. - 2012. - Vol. 116, Iss. 30. - P. 8989-8995.
89. Dzik W. Fresh blood for everyone? Balancing availability and quality of stored RBCs / W. Dzik // *Transfusion Medicine*. – 2008. Vol. 18, Iss. 4. - P. 260-265.
90. Effect of inert gas xenon on the functional state of nucleated cells of peripheral blood during freezing / D. S. Laptev, T. V. Polezhaeva, O. O. Zaitseva [et al.] // *Human Physiology*. – 2015. – Vol. 41, Iss. 2. – P. 109-112.
91. Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts / D. Bravo, Theodore H. Rigley, Nicole Gibran [et al.] // *Burns*. – 2000. – Vol. 26, Iss. 4. – P. 367-378.
92. Effects of cryopreservation with a newly-developed magnetic field programmed freezer on periodontal ligament cells and pulp tissues / S. Abedini, M. Kaku, T. Kawata [et al.] // *Cryobiology*. – 2011. - Vol. 62, Iss 3. – P. 181-187.
93. Effects of different preservation solutions on skin graft epidermal cell viability and graft performance in a rat model / Özgür Başaran, Handan Özdemir, Altuğ Kut [et al.] // *Burns*. – 2006. - Vol. 32, Iss. 4. – P. 423–429.
94. Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal Injury / S. Wilhelm, D. Ma, M. Maze [et al.] // *Anesthesiology*. – 2002. – Vol. 96. – P. 1485–1491.
95. Elford B.C. Functional recovery of smooth muscle after exposure to DMSO and low temperatures / B. C. Elford // *Cryobiology*. – 1970. - Vol. 7, Iss. 2. – P. 148-153.
96. Exploring the Effects on Lipid Bilayer Induced by Noble Gases via Molecular Dynamics Simulations / J. Chen, L. Chen, Y. Wang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. Access mode: <http://www.nature.com/articles/srep17235>.
97. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation / M. A. Srour, Y. Y. Bilo, M. Juma, M. R. Irhimch // *Clinical Hemorheol. Microcircul.* – 2000. - Vol. 23. – P. 13-21.

98. Fahy G. M. Consequences and control of ice formation in the renal inner medulla / G. M. Fahy // *Cryobiology*. – 2013. - Vol. 67, Iss. 3. – P. 409-410.
99. Fahy G. M. Cryopreservation of the mammalian kidney. II. Demonstration of immediate ex vivo function after introduction and removal of 7.5 M cryoprotectant / G. M. Fahy, S. E. Ali // *Cryobiology*. – 1997. Vol. 35, Iss 2. – P. 114-131.
100. Fahy G. M. Principles of Cryopreservation by Vitrification / G. M. Fahy, B. Wowk // *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. – 2014. – Vol. 1257. – P. 21-82.
101. Fahy G. M. The control of ice nucleation and growth in tissues and organs / G. M. Fahy, B. Wowk // *Cryobiology*. – 2013. - Vol. 67, Iss. 3. – P. 401.
102. Faraday M. On Hydrate of Chlorine / Michael Faraday // *Quarterly Journal of Science*. – 1823. - № 15. – P. 71.
103. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? / J. Farrant // *Nature*.- 1969. – Vol. 222, N 5191. - P. 1175 – 1176.
104. Freezing/Thawing without Cryoprotectant Damages Native but not Decellularized Porcine Renal Tissue / N. Poornejad, T. S. Frost, D. R. Scott [et al.] // *Organogenesis*. – 2015. – Vol. 11, Iss. 1. – P. 30-45.
105. Gao S. Investigation of Interactions between Gas Hydrates and Several Other Flow Assurance Elements / S. Gao // *Energy & Fuels*. – 2008. - Vol. 22, Iss. 5. P. 3150–3153.
106. Gordon C. Permeation of dimethylsulfoxide in isolated adult porcine islets of Langerhans / C. Gordon, M. H. Wise // *CryoLetters*. - 1984. – Vol. 5, N 1. – P. 47-63.
107. Hepatic function during xenon anesthesia in pigs / H. Reinelt, T. Marx, J. Kotzerke [et al.] // *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. – 2002. - Vol. 46, Iss. 6 – P. 713–716.
108. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes / M. Solé, J. Santaló, M. Boada [et al.] // *Human Reproduction*. - 2013. - Vol. 28, Iss. 8. P. 2087-2092.
109. Hunt C. J. Cryopreservation of umbilical cord blood: Tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing / C. J. Hunt, S. E. Arn1itage, D. E. Pegg // *Cryobiology*. – 2003. - № 8. –P. 76-78.
110. Influence of cell loss after vitrification or slow-freezing on further in vitro development and implantation of human Day 3 embryos / L. Van Landuyt, H. Van de Velde, A. De Vos [et al.] // *Human Reproduction*. – 2013. – Vol. 28, Iss. 11. – P. 2943-2949.

111. Kanias T. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation / T. Kanias, J. P. Acker // *FEBS Journal*. – 2010. - Vol. 277, Iss. 2. – P. 343–356.
112. Karrow A. M. Cryoprotectants - a new class of drugs / A. M. Karrow // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1969. – Vol. 21, Iss. 4. – P. 209-223.
113. Kiko R. Acquisition of freeze protection in a sea-ice crustacean through horizontal gene transfer? / R. Kiko // *Polar Biology*. – 2010. - Vol. 33, Iss. 4. – P. 543-556.
114. Lawson A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions / A. Lawson, H. Ahmad, A. Sambanis // *Cryobiology*. – 2011. Vol. 62, Iss. 2. – P. 115-122.
115. Leibo S. P. The role of cooling rates in low temperature preservation / S. P. Leibo, P. Mazur // *Cryobiology*. – 1971. – Vol. 8, Iss. 4. – P. 447-452.
116. Leibo S. P. The role of glycerol and dimethylsulfoxide in protecting mouse embryos against freezing damage / S. P. Leibo, P. Mazur // *The journal of cell biology* - 1974. - Vol. 63, N 2. - P. 189.
117. Mazur P. Fundamental Cryobiology and the preservation organs by freezing / P. Mazur // *Organ preservation for transplantation*. – New York; Basel: Marcel Dekker, 1981. – P. 143-176.
118. Mazur P. Survival of foetal rat pancreas frozen to -78 and -196 °C / P. Mazur, J. A. Kemp, R. H. Miller // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 1976. - Vol. 73, N 11. - P. 4105-4109.
119. Meryman H. T. A method for freezing and washing red blood cells using a highglycerol concentration / H. T. Meryman, M. Hornblower // *Transfusion*. – 1972. - № 12. – P. 145-148.
120. Michel H.E. Hermans. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns / Hermans Michel H.E // *Burns*. – 2011. – Vol. 37, Iss. 5. - P. 873 – 881.
121. Multilineage potential of Adult Mesenchymal stem cells / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck [et al.] // *Science*. – 1999. - № 284. - P. 143-152.
122. Murakami K. Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of α -hemoglobin to membrane / K. Murakami, S. Mawatari // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2003. – Vol. 417, Iss. 2. – P. 244–250.
123. Muset P. P. Physiological cell permeability and pharmacological action of DMSO / P. P. Muset, J. Martin-Esteve // *Experientia*. - 1965. – Vol. 21, N 11. - P. 649-651.

124. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage / E. Kozlova [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2015. – Vol. 337, Iss. 2. – P. 192-201.
125. Neuroprotective and neurotoxic properties of the ‘inert’ gas, xenon / D. Ma, S. Wilhelm, M. Maze [et al.] // *British Journal of Anaesthesia*. – 2002. – Vol. 89, № 5. – P. 739–746.
126. Nguyen A. H. Identification of Clathrate Hydrates, Hexagonal Ice, Cubic Ice, and Liquid Water in Simulations: the CHILL+ Algorithm / A. H. Nguyen, V. Molinero V // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. - Vol. 119, Iss. 29. – P. 9369-9376.
127. Noble Gas (Argon and Xenon)-Saturated Cold Storage Solutions Reduce Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model of Renal Transplantation / Y. Irani, J. L. Pype, A. R. Martin [et al.] // *Nephron Extra*. – 2011. - № 1. – P. 272–282.
128. Ozbolat I. T. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation / I. T. Ozbolat // *Trends in Biotechnology*. – 2015. – Vol. 33, Iss. 7. – P. 395-400.
129. Ozbolat I. T. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends / I. T. Ozbolat, Y. Yu // *Biomedical Engineering, IEEE Transactions*. - 2013. - Vol. 60, Iss. 3. P. 691-699.
130. P. Factors influencing renal cryopreservation. Effects of three vehicle solutions and the permeation kinetics of three cryoprotectants with rabbit cortical slices / P. Clark, G. M. Fahy, A. M. Karrow // *Cryobiology*. – 1984. – Vol. 21, Iss. 3. – P. 260-273.
131. Pandey K. B. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans / K. B. Pandey, S. I. Rizvi // *Oxidative Med. and Cell. Longevity*. – 2010. - Vol. 3, Iss.1. – P. 2-12.
132. Pauling L. A molecular theory of general anesthesia / L. Pauling // *Science*. — 1951. — Vol. 134, N 3471. — P. 15—21.
133. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Promotes Lymphocyte Survival through Its Actions on Cellular Metabolic Activities / J. Seung-Hee, Y. Chunyan, M. Qi [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2006. - № 177. – P. 3737-3745.
134. Physical and biological aspects of renal vitrification / G. M. Fahy, B. Wowk, R. Pagotan [et al.] // *Organogenesis*. - 2009. - Vol. 5, Iss. 3. P. 167-175.
135. Pirzadeh P. Molecular insights into clathrate hydrate nucleation at an ice-solution interface / P. Pirzadeh, P. G. Kusalik // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – Vol. 135, Iss. 19. – P. 7278-7287.

136. Polge C. Preservation of bull sperm at -70°C / C. Polge, J. E. Lovelock // *Vet. Rec.* – 1952. № 64. P. 296–297.
137. Polge C. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures / C. Polge, A. U. Smith, A. S. Parkes // *Nature*. – 1949. – Vol. 164, №4172. – P. 166.
138. Prehoda R. W. Suspended animation - the research possibility that may allow man to conquer the limiting chains of time / R. W. Prehoda. – Philadelphia.: Chilton Book Company, 1969. – 211 p.
139. Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon / C. Petzelt, P. Blom, W. Schmehl [et al.] // *Life Sciences*. – 2003. - Vol. 72, Iss. 17. – P. - 1909–1918.
140. Raymond J. A. Ice-binding proteins from enoki and shiitake mushrooms / J. A. Raymond, M. G. Janech // *Cryobiology*. – 2009. - Vol. 58, Iss. 2. – P. 151-156.
141. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank / J. C. Cluitmans, M. R. Hardeman, S. Dinkla [et al.] // *Blood Transfusion*. – 2012. - № 10. - P. 12–18.
142. Rodin V. V. Structural variation in DNA-bound water-xenon system / V.V. Rodin, I. A. Novikov, V. Ya Volkov // XVth International Conference on Magn. Reson. in biological systems (July 1992- Jerusalem, Israel): abstracts. - Jerusalem, 1992. - P. 046.
143. Rodin V.V. The effect of xenon on the state of DNA-bound water systems using a method of NMR / V. V. Rodin, F. Sh. Isangalin, V. Ya. Volkov // 8th Research Conference of A-U.S.R.Institute for Applied Microbiology (Russia, Obolensk, 1984). - inv. N 158.
144. Rous P. The preservation of living red blood cells in vitro. I. Methods of preservation / P. Rous, J. R. Turner // *J Exp Med*. – 1916. - № 23. – P. 219–237.
145. Rous P. The preservation of living red blood cells in vitro. II. The transfusion of kept cells / P. Rous, J. R. Turner // *J Exp Med*. – 1916. - № 23. – P. 239–248.
146. Sanborn N. The influence of dimethylsulfoxide on cellular ultrastructure and cytochemistry / N. Sanborn, N. Stephane, M. Bendayan // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1975. – Vol. 243. - P. 122-138.
147. Scott M. D. H_2O_2 injury in β thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH / M. D. Scott // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 40, Iss. 7. – P. 1264–1272.

148. Seino K. Protective Effects of Pressurized Addition of Xenon Gas against Cold Damage in Cell Monolayer / K. Seino, K. Sato, M. Ujihira // 35th Annual International IEEE EMBS Conference (Japan, Osaka, July 3-7, 2013).

149. Shlafer M. Pharmacological consideration in cryopreservation / M. Shlafer // Organ preservation for transplantation. - New York; Basel: Marcel Dekker, 1981. – P. 117-211.

150. Simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences / J. M. Alonso, D. M. Regan, C. E. Johnson [et al.] // Cytotherapy. - 2001. - № 3. - P. 429-433.

151. Slow freezing should not be totally substituted by vitrification when applied to day 3 embryo cryopreservation: an analysis of 5613 frozen cycles / H. Y. Zhu, Y. M. Xue, L. Y. Yang [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2015. – Vol. 32, № 9. – P. 1371-1377.

152. Stem cells - biological update and cell therapy progress / M. Girlovanu, S. Susman, O. Soritau [et al.] // Clujul Medical. – 2015. – Vol. 88, № 3. – P. 265-271.

153. Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval [Electronic resource] / J. O. Doyle, K. S. Richter, J. Lim [et al.] // Fertility and Sterility. – 2015. – Access mode: [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(15\)02037-3/abstract](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(15)02037-3/abstract).

154. Successful storage of RBCs for 10 weeks in a new additive solution / Hess J. R., Rugg N., Knapp A. D. [et al.] // Transfusion. – 2000. - Vol 40, Iss. 8. P. 1012-1016.

155. Superheating of Ice in the Presence of Ice Binding Proteins / Y. Celik, L. A. Graham, Y. F. Mok [et al.] // Biophysical Journal. – 2010. - Vol. 98, Iss. 3. – P. 245a.

156. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing [Electronic resource] / Deller, R. C. [et al.] // Nature communications – 2014. – №5. – Access mode: <http://www.nature.com/ncomms/2014/140203/ncomms4244/full/ncomms4244.html>.

157. Szer J. Cryopreservation and functional assesment of harvested bone marrow and blood stem cells / J. Szer // Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation. – 2004. - № 6. – P. 450-453.

158. Tatsuro Y. Anaerobic storage of red blood cells / Y. Tatsuro, S. S. Shevkoplyas // Blood Transfusion. – 2010. - № 8. - P. 220-236.

159. The Israel National Skin Bank: quality assurance and graft performance of stored tissues / H. Ben-Bassat, M. Chaouat, E. Zumai [et al.] // *Cell and Tissue Banking*. – 2000. – Vol. 1, Iss. 4. - P. 303–312.
160. The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice / H. M. Homi, N. Yokoo, D. Ma [et al.] // *Anesthesiology*. – 2003. – Vol. 99. – P. 876–881.
161. The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC- ϵ and p38 MAPK / N. C. Weber, O. Toma, J. I. Wolter [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2005. - Vol. 144, № 1. – P. 123–132.
162. The Use of Inert Gas Xenon for Cryopreservation of Leukocytes D. S. Laptev, T. V. Polezhaeva, O. O. Zaitseva [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2014. - Vol. 157, Iss 2. – P. 282-284.
163. Thomas E. Clathrates: little known components of the global carbon cycle [Electronic resource] / Ellen Thomas - Access mode: <https://ethomas.faculty.wesleyan.edu/>.
164. Tissue and corneal donation and transplantation in the UK / L. Gaum, I. Reynolds, M. N. A. Jones [et al] // *British Journal of Anaesthesia*. – 2012. Vol. 108 (S1). - P. i43–i47.
165. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells / X. B. Zhang, K. H. Yau, K. S. Tsang [et al.] // *Transfusion*. - 2003. - № 43. - P. 265-272.
166. Tyrrell R. M. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells / R. M. Tyrrell, L. A. Applegate, P. Luscher // *Cancer Res*. - 1991. — Vol. 51. - P.974-978.
167. Uedaira H. Water of Living System / H. Uedaira, A. Ohsaka. - Tokyo: Kodansha, 1989. - P. 55-61.
168. Uptake and removal of dimethylsulfoxide in rabbit and human corneas during cryopreservation / H. F. Edelhauser, A. B. Gallun, D. L. Van Horn [et al] // *Cryobiology*. – 1971. - Vol. 8, Iss. 1. – P. 104-107.
169. Viability of cryopreserved human skin allografts: effects of transport media and cryoprotectant/ S. Gaucher, C. Elie, O. Ve´rola [et al.] // *Cell Tissue Banking*. – 2012. - Vol. 13, Iss. 1. – P. 147-155.

170. Water permeability parameters of mouse sperm during freezing in the presence of extracellular ice and glycerol / R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, K. P. Roberts [et al.] // *Cryobiology*. – 1998. - Vol. 37. P. 416–417.
171. Weiner N. D. Interactions of dimethylsulfoxide with lipid and protein monolayers / N. D. Weiner, M. Y. Lu, M. Rossof // *Journal of Pharmacological Sciences* – 1972. – Vol. 61, Iss. 7. - P. 1098-1101.
172. Williams R. J. The distribution of cryoprotective agents into lipid interfaces / R. J. Williams, D. Harris // *Cryobiology*. – 1977. – Vol. 14, Iss. 6. – P. 670-680.
173. Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo / B. Preckel, J. Mullenheim, A. Moloschavij [et al.] // *Anesthesia & Analgesia*. – 2000. - Vol. 91, Iss. 6. – P. 1327–1332.
174. Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat / D. Ma, H. Yang, J. Lynch [et al.] // *Anesthesiology*. – 2003. – Vol. 98. – P. 690–698.
175. Xenon induces late cardiac preconditioning in vivo: a role for cyclooxygenase 2? / N. C. Weber, J. Frassdorf, C. Ratajczak [et al.] // *Anesthesia & Analgesia*. – 2008. - Vol. 107, Iss.6. – P. 1807–1813.
176. Xenon preconditioning protects against renal ischemic- reperfusion injury via HIF-1 α activation / D. Ma, T. Lim, J. Xu [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2009. – Vol. 20, № 4. - P. 713–720.
177. Yamamuro O. Ordering of hydrogen bond system in clathrate hydrate / O. Yamamuro. - Osaka University 61, 1988. - P. 18-22.
178. Zhang X Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting / X. Zhang, Y. Zhang // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2015. - Vol. 72, Iss 3. – P. 777-782.