

Пономарев Александр Игоревич

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

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2016

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Макеев Олег Германович

Официальные оппоненты:

Онищенко Нина Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова» Минздрава России, главный научный сотрудник отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии

Суховой Юрий Геннадьевич - доктор медицинских наук, профессор, научно-производственное объединение «Тюменькриобанк», заместитель директора по науке

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в _____ ч. на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 208.102.03, созданного на базе Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, Екатеринбург, ул. Репина, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке имени В.Н. Климова ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, Екатеринбург, ул. Ключевская, д.17, с авторефератами на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: www.vak2.ed.gov.ru и на сайте университета: www.usma.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2016

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор

**Базарный
Владимир Викторович**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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 [Васильев А. В. и соавт., 2010; Ткачук В.А. и соавт., 2012; Заграничнов В. Д. и соавт., 2013]. 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 [Шумаков В.И. и соавт., 1975; Онищенко Н.А., 1995; Girlovanu M. et al., 2015]. 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 [Farrant J., 1969; Weiner N. D. et al., 1972]. 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 [Poornejad N. et al., 2015; Wu Y. et al., 2015; Best B. P., 2015].

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 °С и выше) не происходит значительных конформационных перестроек макромолекул и структуры воды [Abazari A. et al., 2013].

Одним из перспективных способов гипотермической консервации может стать хранение биообъектов в газовых гидратах – клатратах при +4 °С. 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 [Родин В.В. и соавт., 1981; Дядин Ю. А., 1998; Довгуша В.В. и соавт., 2012], что исключает потенциальную возможность образования в биообъекте кристаллов, а так же 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 [Sheleg S. et al., 2008; Тельпухов В. И., Щербаков П.В., 2012; Seino K. et al., 2013; Пульвер А. Ю. и соавт., 2014; Худяков А. Н. и соавт., 2014]. 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 °С) путем оценки их морфофункциональных характеристик.

2. Исследовать возможность использования сочетанного воздействия глубокой гипотермии (+4 °С) 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 значимо 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.

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 так же 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.

Основные положения, выносимые на защиту

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.

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 изданиях, рекомендованных ВАК, 5 публикаций в том числе 3 публикации в зарубежных журналах, а также 2 патента.

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.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования. В работе исследовали 63 образца эритроцитов крови человека, а также 56 культур фибробластоподобных клеток, полученных из полнослойных кожных лоскутов человека, предназначенных для утилизации, в ГОБУЗ «ЦГКБ» г. Екатеринбурга. Все исследования проводились в рамках протокола, одобренного ЛЭК УГМУ. В работе так же были использованы кожные лоскуты, полученные с дорсальной области проксимальной части хвостов 28 беспородных белых половозрелых крыс – самцов, при проведении экспериментов с которыми неуклонно соблюдались положения Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Полученный биоматериал был разделен на опытные группы: гипербарическая консервация и клатратная консервация с ксеноном, гипербария+стандартный консервант, клатраты+стандартный консервант, негативный контроль, предусматривающий хранение биообъектов без каких-либо консервантов, а так же контрольная группа, представляющая собой «свежий» биообъект без консервации. Контрольной группой в экспериментах с эритроцитами была группа клеток, консервированных в растворе стандартного консерванта - ЦФДА-1 (Фаглюцид, Россия). Для фибробластоподобных клеток и кожных лоскутов в качестве дополнительной группы сравнения использовали криоконсервацию в 10% ДМСО при -84 °С.

Для консервации в различных термобарических условиях ксенона использовали специальные приборы, разработанные по типу герметичных барокамер, с возможностью визуализации консервируемых биообъектов и регистрации параметров температуры и давления подаваемого газа (приборы были разработаны при поддержке гранта фонда И.М. Бортника). Для экспериментов использовали технический ксенон высокой степени чистоты (99,9995% Iceblick ltd, ГОСТ – 10218-77) и технический воздух в качестве промывочного газа на этапах декомпрессии образцов (ЗАО ПТК «Криоген», ГОСТ – 17433-80, марка – 20,9). Газы подавались в рабочую камеру посредством

редуктора (GCE, 00/10) через универсальный порт, выполненный по типу быстроразъемного соединения. Контроль образования клатратов Хе осуществляли визуально, через прозрачные окна прибора. Опытным путем было определено, что образование клатратов в рабочей камере регистрировалось с момента достижения давления ксенона ≥ 6 атм. при температуре $\leq +4,0$ °С. При этом через прозрачные окна наблюдалось изменение состояния опытных образцов от жидкого - к прессованному снегу, через промежуточный этап замедления текучести. С целью предотвращения образования клатратов в образцах, консервированных в гипербарической атмосфере ксенона, использовали давление не выше 3 атм. при температуре $\leq +4,0$ °С.

Количество клеток оценивали кондуктометрическим методом с использованием гематологического анализатора (Nihon Cohden). Расчет показателей гемолиза, кривых осмотической резистентности эритроцитов, а также исследование жизнеспособности тканей с использованием МТТ-теста (МТТ TOX1-1КТ, Sigma Aldrich) проводили спектрофотометрическим методом (Ultrospec 1100). Жизнеспособность культур ядродержащих клеток изучали окрашиванием флуоресцентным красителем Life-Dead viability Kit (Life Technologies) на флуоресцентном визуализаторе ZOE Fluorescent cell imager (BIO-RAD). Экспансию фибробластов из кожных лоскутов исследовали методом первичного эксплантата [Фрешни Р. Я. 2011].

Морфологические характеристики клеток исследовали с использованием окраски гематоксилин-эозином, по Вейгерту-Ван Гизону, а так же по Романовскому-Гимза (Bio-Optica Milano S.P.A.) согласно стандартных методик. Визуализацию и описание препаратов проводили с использованием оптических микроскопов (Olympus CX 41, СКХ 41). Визуализацию мембран клеток в ксенон-клатратном льду проводили в Ольборгском Университете (Дания) на сканирующем электронном микроскопе Zeiss EVO со встроенным криостолком, позволяющим поддерживать необходимую температуру для стабилизации клатратов.

Метод исследования функциональной сохранности консервированных клеток и тканей включал модельные эксперименты по изучению динамики

приживаемости кожных лоскутов согласно общепринятого способа [O. Basaran et al., 2006]. Скорость оседания эритроцитов оценивали методом капилляров. Способность мембран эритроцитов к деформации изучали методом регистрации средней осмотической хрупкости. Для оценки клоногенной активности культивируемых клеток применяли метод подсчета колониеобразующих единиц, а синтетическую активность расконсервированных клеток оценивали по способности к включению в ДНК меченого предшественника синтеза ДНК 2^{14}C - тимидина с регистрацией радиоактивности на сцинтилляционном счетчике Бета-2 и выражали в Бк/ 10^6 клеток.

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 тест Шапиро-Вилкокса на нормальность распределения результатов. В случае нормального распределения использовали параметрический критерий Стьюдента и дисперсионный ANNOVA анализ. В остальных случаях вероятность ошибки (p) рассчитывали с использованием непараметрических критериев: критерий Краскелла-Уоллиса и тест Бенферони-Данна. Первичные данные вводили на табличном процессоре 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 $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Консервация эритроцитов в атмосфере ксенона и его клатратах

Исследуемые параметры количества эритроцитов, среднего объема и содержания гемоглобина (Hb), а также скорость оседания Эр представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Морфофункциональные показатели консервированных эритроцитов после 30-ти суточного хранения при +4 °С

Исследуемые группы	Измеряемые параметры			
	Количество Эр, 10 ¹² /л	Средний объем Эр (фл)	Среднее содержание Hb в Эр (пг)	СОЭ (мм/ч)
ЦФДА-1 (контроль)	5,27±0,19	85,48±2,124	31,39±0,431	1,37±0,397
Интактные Эр	5,83±0,302*	85,18±0,109	30,62±0,148	1,92±0,130*
Гипербария Хе+ЦФДА-1 (3 атм.)	5,82±0,413*	85,68±0,878	30,96±0,436	1,51±0,413
Гипербария Хе (3 атм.)	5,26±0,808	91,26±2,037*	30,99±0,378	0,82±0,171*
Клатраты Хе (6 атм.)	3,68±0,447*	91,36±1,312*	31,31±0,56	1,01±0,337
Клатраты Хе+ЦФДА-1 (6 атм.)	4,0±0,632*	90,62±1,248*	31,14±0,505	1,30±0,300
Негативный контроль	3,55±0,273*	89,38±0,281*	31,70±0,234	4,18±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 10,4 % превышало контроль и достоверно не отличалось от группы неконсервированных Эр (5,82 и 5,83).

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 негативном контроле 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 Hb в

Эр, консервированных с гипербарией+ЦФДА-1, не выявила статистически значимых различий с контролем.

С целью оценки изменения мембран Эр оценивали количество пойкилоцитов, дегмацитов и анизоцитов. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Гистологическая характеристика консервированных эритроцитов после 30 – ти суточного хранения при +4 °С

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±0,26*	0±0*
Гипербария Хе+ ЦФДА-1 (3 атм.)	1,41±0,594*	0,16±0,159*	13,46±0,342	2,76±1,907*
Гипербария Хе (3 атм.)	1,31±0,384*	1,67±0,653*	17,95±1,14*	17,81±4,206
Клатраты Хе (6 атм.)	1,62±0,595*	3,16±0,441*	25,12±4,219*	29,65±1,631*
Клатраты Хе+ЦФДА-1 (3 атм.)	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. 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 ($p \leq 0,05$).

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. 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, было достоверно ниже всех опытных групп, кроме группы контроля.

Статистически значимые различия наблюдаются так же в степени выраженности анизоцитоза. 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 наименьший процент анизоцитов в сравнении с ЦФДА-1 на 2,29 % (на 14,54%).

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 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 5,7 раза ниже группы сравнения – ЦФДА-1.

В проведенных исследованиях показано наличие консервирующего эффекта ксенона на суспензию Эр в условиях глубокой гипотермии (+4 °С). В максимальной степени этот эффект был выражен в случае сочетанного применения с конвенциональным гемоконсервантом ЦФДА-1. Так, показатели среднего объема, среднего содержания Нв в Эр, анизоцитоза и СОЭ в исследуемой группе не демонстрировали достоверных различий в сравнении с контрольной группой, а значения гемолиза, дегмацитов и осмотической стойкости показали не только значительные отличия от контроля, но и приближались к таковым у интактных (неконсервированных) Эр (рисунок 1).

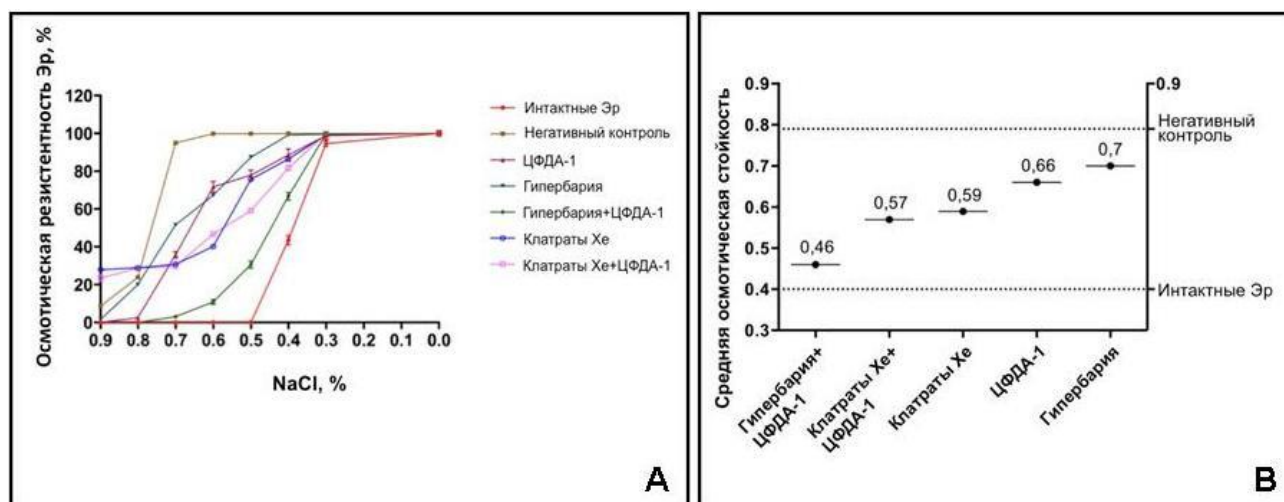


Рисунок 1 - Осмотическая резистентность Эр. А- кривые осмотической резистентности Эр. В – средняя осмотическая резистентность Эр

Выраженный консервирующий эффект гипербарической атмосферы Хе на суспензию Эр обусловлен механизмом равновесной экстракции менее тяжелого газа – кислорода на более тяжелый – 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 на фоне высокого парциального давления Хе, что исключает их воздействие на Эр. Таким образом, на фоне исключительности в Эр анаэробного гликолиза, главным повреждающим агентом во время консервации Эр остается кислород. При этом аноксическую атмосферу можно считать наиболее предпочтительной для консервации Эр.

Важным представляется то, что образование клатратных структур в Эр в условиях глубокой гипотермии не сопровождалось наличием сколько-нибудь значимого консервирующего эффекта, а наоборот, стимулировало их повреждение, проявляющееся значительным гемолизом в суспензии. Однако, несмотря на это, многие показатели не претерпели существенного изменения. Например, параметры СОЭ и количество анизоцитов были сопоставимы с контролем, а по показателям средней осмотической стойкости и количеству пойкилоцитов консервируемая в клатратах Хе суспензия Эр демонстрировала лучшие результаты, даже в сравнении с контролем.

Консервация кожных лоскутов в гипербарии и клатратах ксенона

Результаты, полученные в группе с клатратами Хе в условиях глубокой гипотермии (+4 °С), указывают на лучшую жизнеспособность лоскутов, консервированных данным способом. Сохранность кожных лоскутов 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 при +4 °С и 10% ДМСО при криогенных температурах (-84 °С) изменяют их в большей степени (рисунок 2).

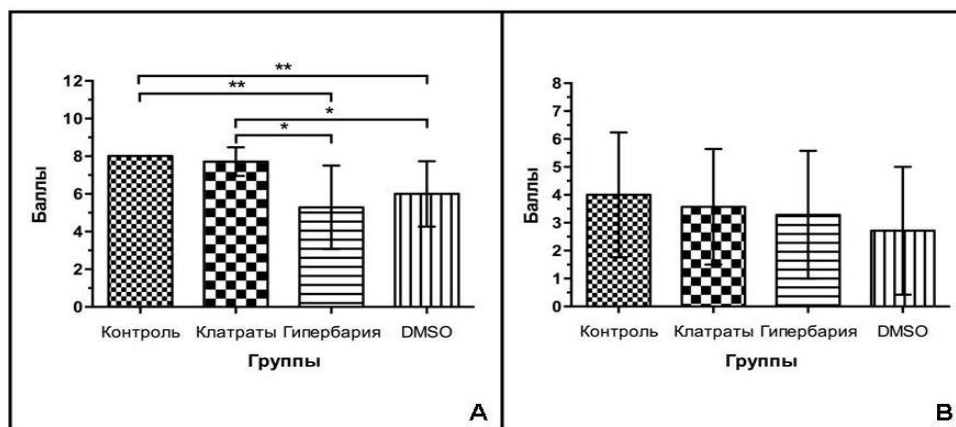


Рисунок 2 - Графики показателей оценки жизнеспособности кожных лоскутов после 7-ми суточного хранения различными способами. А – микроскопические показатели оценки. В - макроскопические показатели оценки. Квадратными скобками указаны достоверные различия

Количество и качество отсроченных приживленных лоскутов так же подтверждает эти данные (рисунки 3,4). Наибольшее количество отсроченных приживлений в сравнении с контролем было зафиксировано в группе с клатратами Хе при +4 °С, в то время как для других опытных групп данный показатель был в 2 раза меньшим (таблица 3).

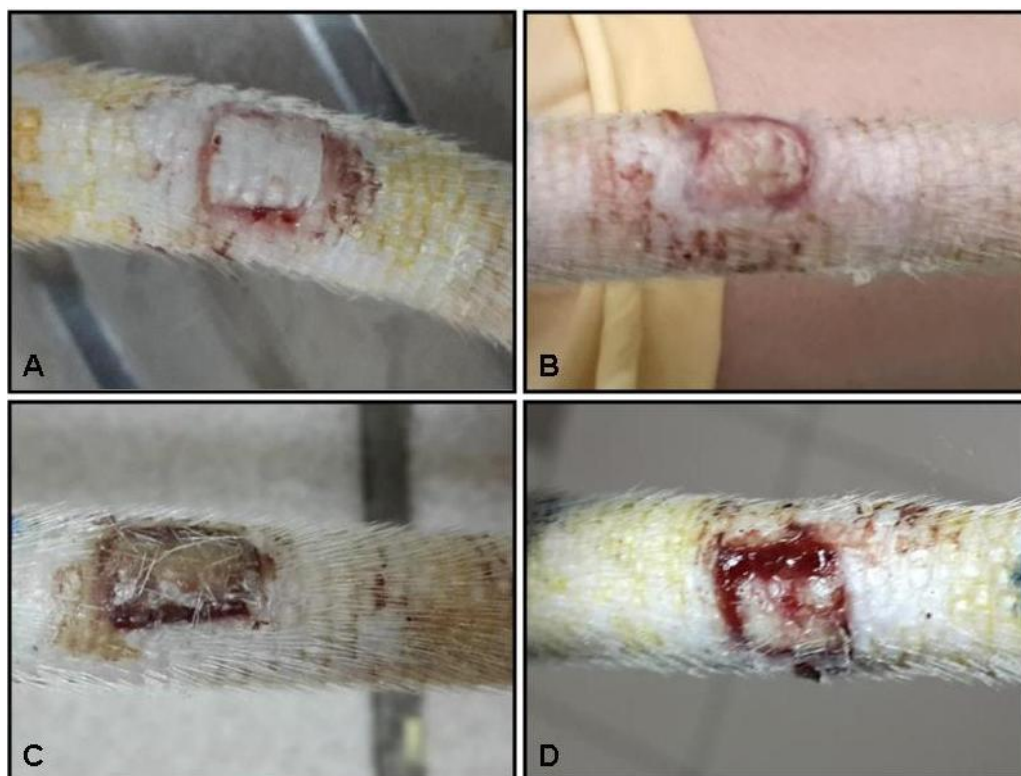


Рисунок 3 - Динамика приживления расконсервированных аутологичных кожных лоскутов на 14-е сутки после трансплантации. А- Интактный кожный лоскут. В – Кожный лоскут, консервированный в клатратах Хе. С – Кожный лоскут, консервированный в ДМСО. D – Кожный лоскут, в гипербарии Хе

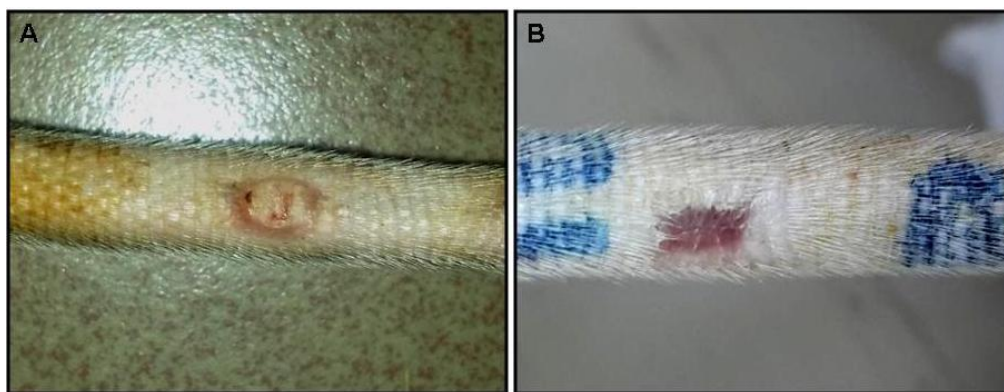


Рисунок 4 - Макроскопическая картина приживления кожных лоскутов на 28-е сутки после трансплантации. А – полное приживление в группе с клатратами Хе. В – Отторжение трансплантата (кожного лоскута) и заживление раны по типу вторичного натяжения в группе с ДМСО

Таблица 3 - 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

Результаты оценки эпидермального и дермального слоев кожи так же демонстрируют наилучшую сохранность в группе с клатратами Хе при +4 °С. Так, показатели поглощения тетразолиевых солей кератиноцитами были на 31,2 % выше таковых в группе с ДМСО при -84 °С и на 55,8 % выше, чем в группе с гипербарией Хе при +4°С (рисунок 5А). Экспансия фибробластов в наименьшей степени отличалась от контроля для группы с клатратами Хе (рисунок 5В).

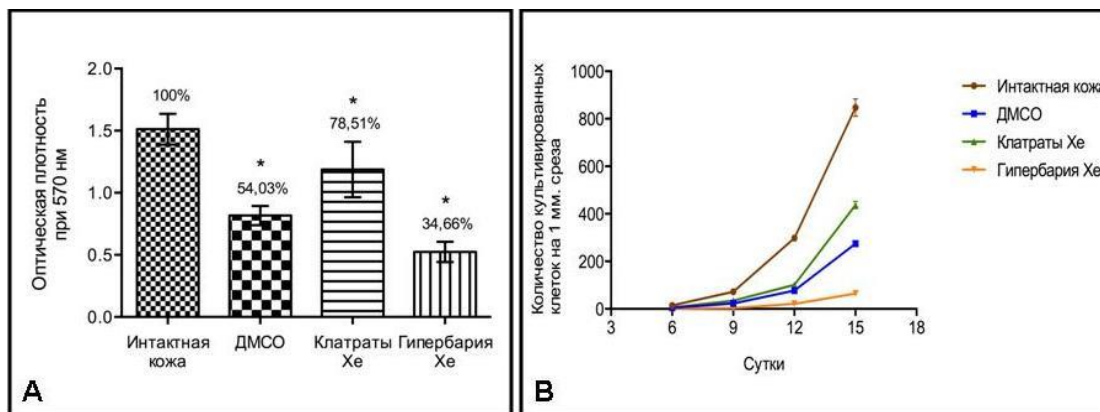


Рисунок 5 - Графики жизнеспособности эпидермального и дермального слоев кожи после консервации различными способами. А – Интенсивность поглощения и преобразования тетразолиевых солей в формазан кератиноцитами эпидермиса. В – количество экспансированных дермальных фибробластов

В проведенных исследованиях было показано наличие большего консервирующего эффекта клатратов Хе на кожные лоскуты при глубокой гипотермии в сравнении с другими методами консервации. Ведущим консервирующим механизмом в группе с клатратами Хе может быть клатратный анабиоз – иммобилизация молекул воды в клатратах и угнетение биохимических реакций. Механизмом, объясняющим разрушающее воздействие гипербарии Хе, может быть сохранение остаточной метаболической активности в отсутствие доступа кислорода с постепенной гибелью функционирующих клеток при +4 °С. Вместе с тем, наличие некоторого консервирующего действия гипербарии Хе может указывать на защитные свойства самого газа. Таким образом, использование гипербарии Хе при +4 °С, продемонстрировавшей наилучшую сохранность для Эр, оказывается не лучшей для клеток, содержащих ядро и митохондриальные компартменты. Означенное обусловило необходимость проведения исследования, предметом которого являлось изучение консервирующих свойств Хе и его клатратов на модели краткосрочного хранения изолированных фибробластоподобных клеток.

Исследование механизмов консервирующего эффекта ксенона на ядродержащие клетки

В проведенных исследованиях было изучено воздействие различных условий Хе: гипербария и клатраты при +4 °С на сохранность как адгезированных, так и суспензионных культур фибробластоподобных клеток, выделенных из кожных лоскутов. Данные представлены на рисунке 6.

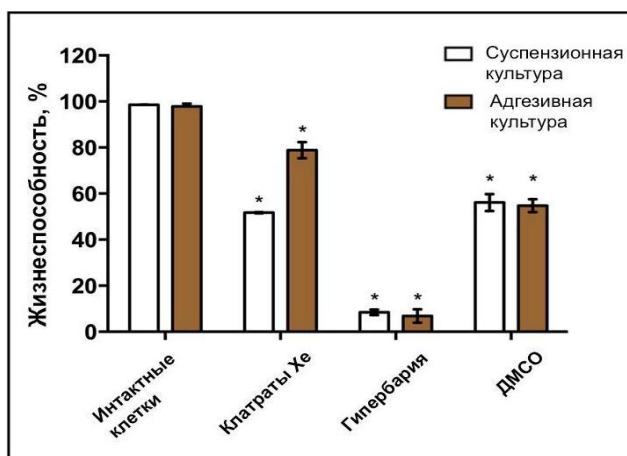


Рисунок 6 - Жизнеспособность адгезированных и суспензионных культур клеток после консервации различными способами (звездочками указаны достоверные различия с контролем – неконсервированными клетками)

Показано, что клетки адгезированных культур в 1,5 раза лучше сохраняют жизнеспособность при консервации в клатратах Xe по сравнению с клетками неадгезированных культур и в 1,44 раза с клетками, консервированными в ДМСО при -84°C . При использовании ДМСО достоверной разницы в жизнеспособности разных типов культур выявлено не было. Так же показано, что в адгезированных культурах, консервированных в клатратах Xe, наблюдается большая сохранность функциональных характеристик клеток (рисунок 7).

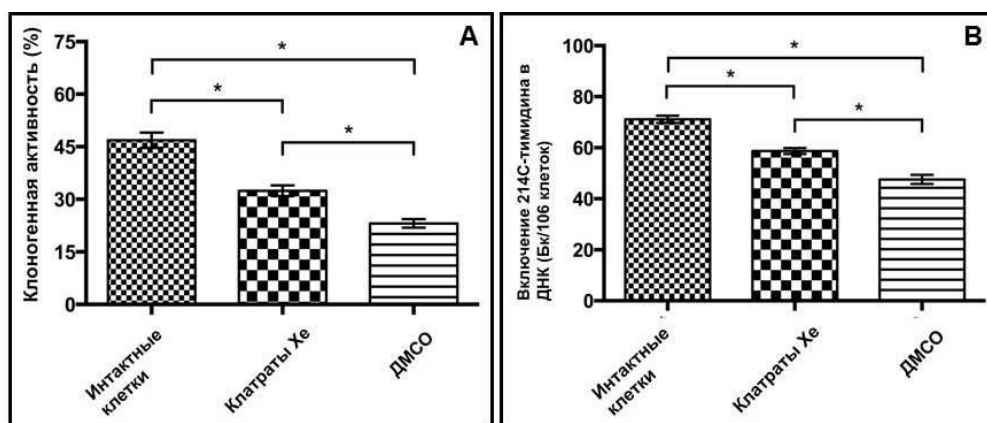


Рисунок 7 - Функциональная активность клеток после консервации различными способами. А – клоногенная активность клеток после консервации. В – синтетическая активность клеток после консервации

Визуализация клеток, консервированных в клатратах, а также самой структуры ксенон-клатратного льда не выявила значимого воздействия данных условий на мембраны консервируемых клеток (рисунок 8).

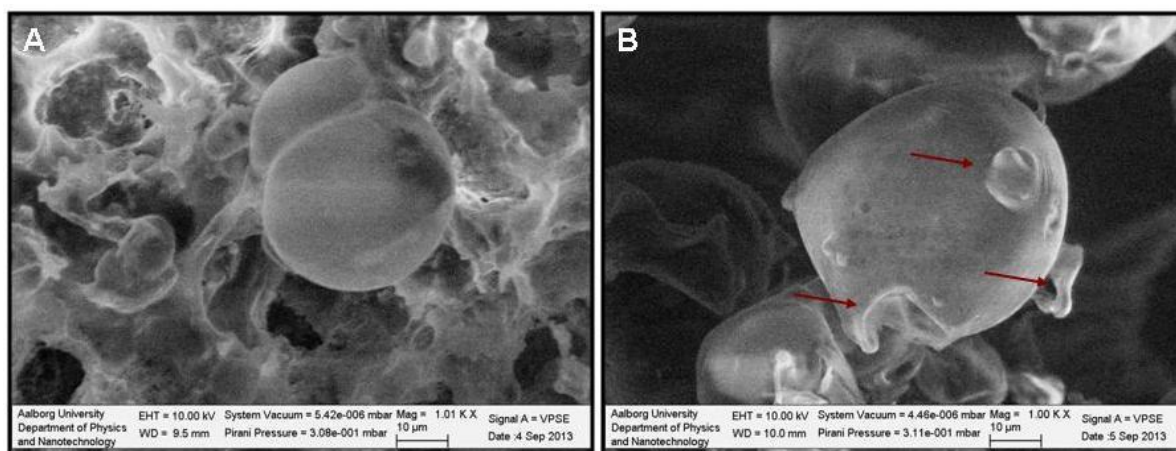


Рисунок 8 – Сканирующая электронная микроскопия клеток во время консервации. Увеличение в 1000 раз. А – Клетки, консервированные в клатратах Xe. В – Клетки, консервированные в гипербарии Xe. Стрелками указаны поврежденные участки цитоплазматической мембраны

Большая сохранность жизнеспособных клеток и их функциональных характеристик в образцах адгезированных культур может быть следствием их особой организации в процессе адгезии на пластике и выработкой ими различных цитокинов, моделирующих окооклеточную среду в ткани, демонстрировавшей значительный консервирующий эффект клатратов Xe. Таким образом, механизмы действия клатратов и гипербарии Xe в условиях глубокой гипотермии могут быть общими для изученных клеток, находящихся как в составе ткани, так и в виде изолированной культуры.

Фактические результаты настоящего исследования, известные литературные данные и вероятные механизмы реализации консервирующего действия ксенона и его клатратов представлены на схеме (рисунок 9).

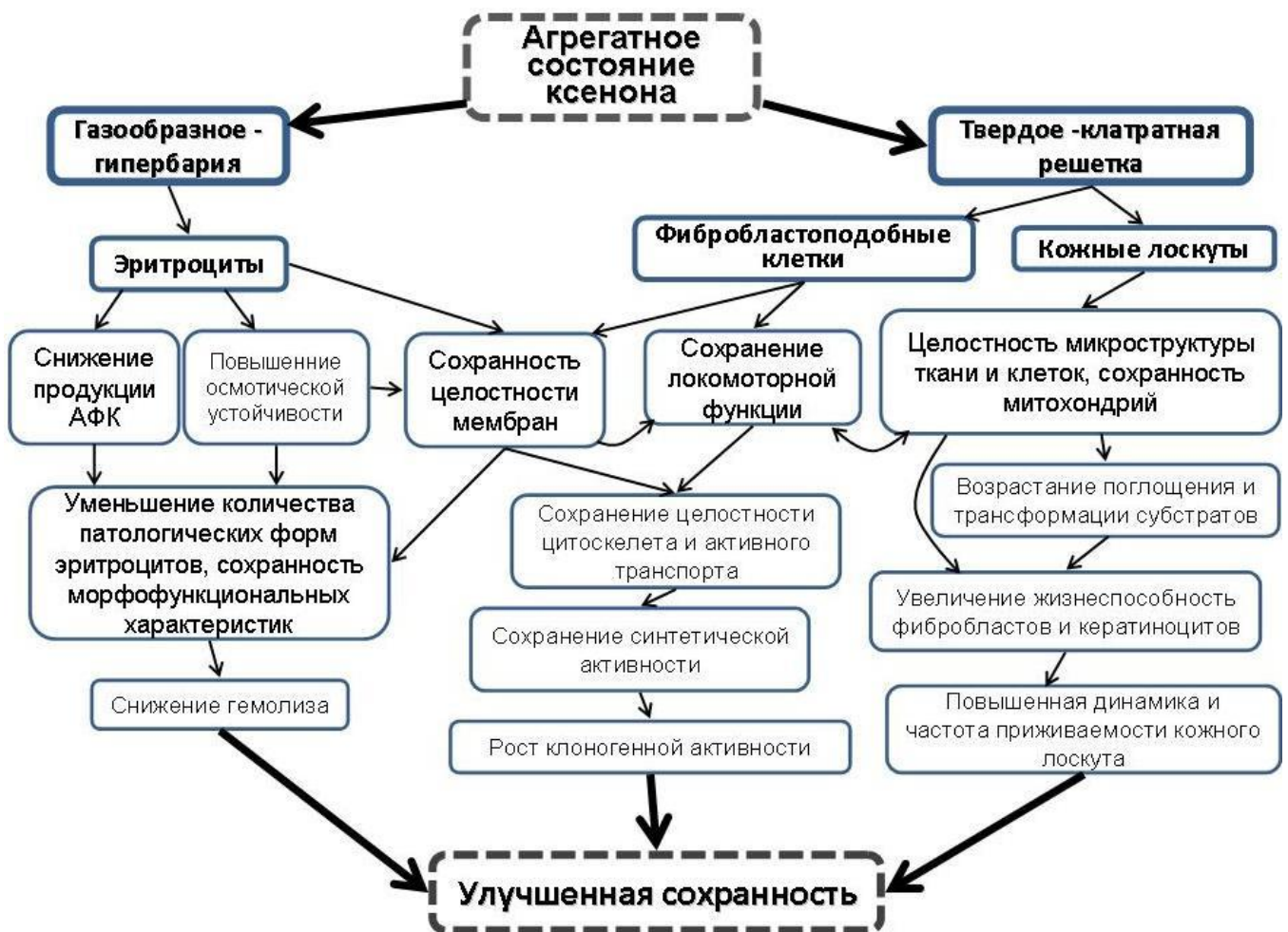


Рисунок 9 - Механизмы действия ксенона и его клатратов на различные виды консервируемых биообъектов

На основе полученных данных была предложена гипотеза, обобщающая механизмы патогенетического действия гипербарии и клатратов ксенона на Эр и фибробластоподобные клетки в условиях глубокой гипотермии (+4 °С) (рисунок 10). Общим процессом, протекающим как в Эр так и в клетках, является гликолиз [А]. Однако в клетках в физиологических условиях он протекает с образованием АцКоА, необходимого для дальнейшего включения в ЦТК и ЭТЦ [D], генерирующих основное количество АТФ, в то время как в Эр конечным продуктом реакции считается образование лактата и нескольких молекул АТФ [А]. Малого количества энергии достаточно для обеспечения жизнедеятельности Эр, в которых отсутствуют развитые синтетические процессы. Поэтому при воздействии на Эр гипербарии Хе в них не происходит фатальных изменений на фоне интенсификации реакций анаэробного гликолиза [А]. Вместе с тем, гипербария Хе останавливает реакцию оксигенации НЬ и, возможно, трансформацию в метгемоглобин [С], запускающий ПОЛ [G,F]. Напротив, для клеток гипербария Хе может быть губительна ввиду O₂-зависимого энергопотребления. Поэтому единственным механизмом, способным уравновесить потребление и продукцию энергии, будет иммобилизация воды в клатратную решетку, останавливающая гидролиз АТФ и блокирующая транспорт веществ в них [E,D]. При этом процессы радикалообразования и ПОЛ оказываются блокированными, так как основным их источником в клетках считается ЭТЦ [D,F]. Это состояние может достигаться клатрированием клеток как во взвеси, так и в неразделенных тканевых структурах – кожных лоскутах.

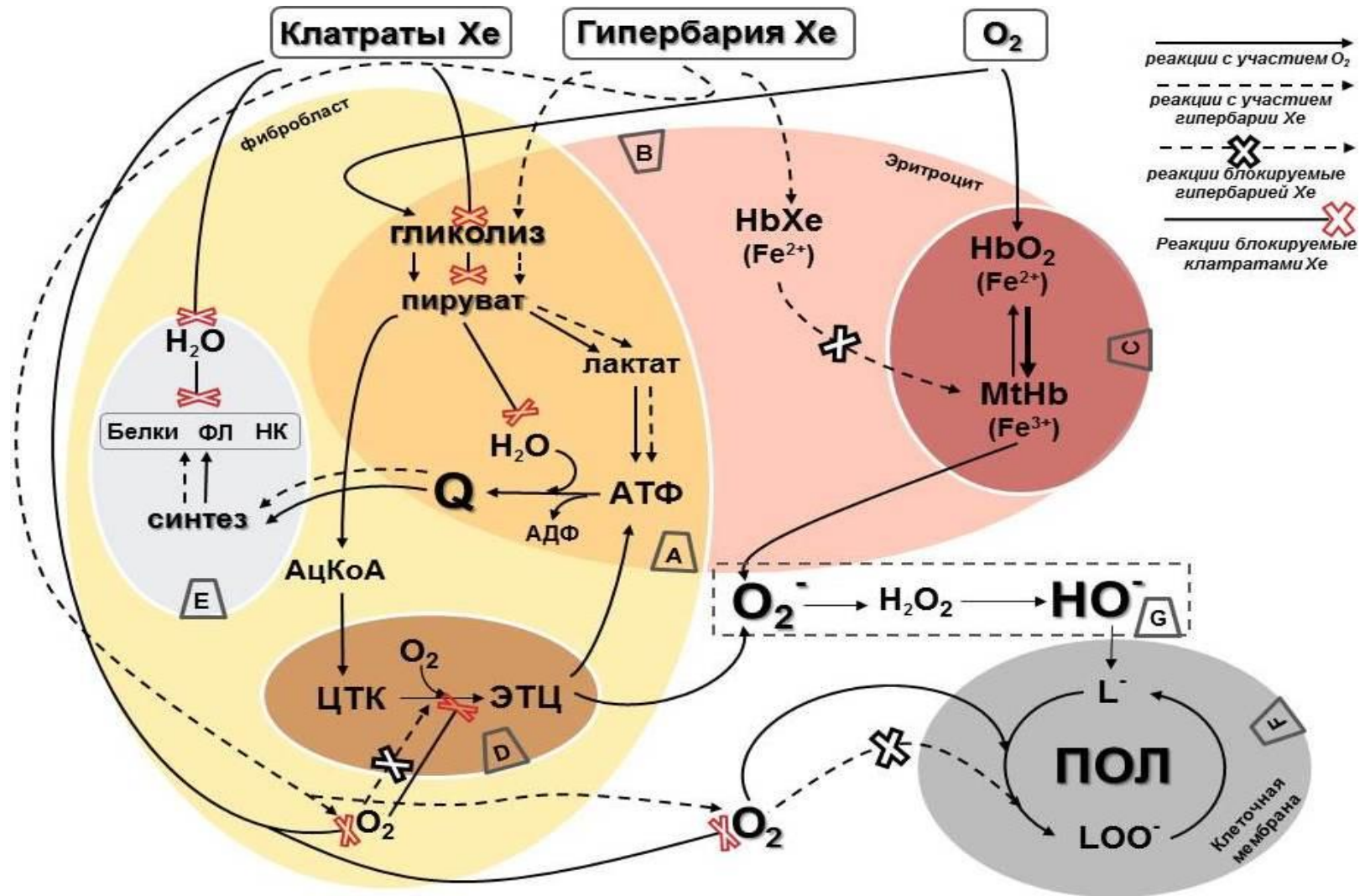


Рисунок 10 – Гипотеза патогенетического действия ксенона и клатратов на эритроциты (красный) и фибробластоподобные клетки (желтый). Специфический метаболизм: синтетический (E) и энергетический (D) характерный для фибробластоподобных клеток. Реакции связывания гемоглобина с ксеноном (B) или кислородом (C) характерные для эритроцитов. Общие метаболические реакции характерные для обоих типов клеток: ПОЛ (F), образование активных форм кислорода (G), гликолиз (A). Сокращения: Q – энергия.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Макеев О.Г. Применение клатратобразующего газа для криоконсервации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / О.Г. Макеев, А.И. Пономарев, А.В. Коротков // Вестник уральской медицинской академической науки. - 2010. - № 1. - С. 49-53.**
2. Пономарев А.И. Ксенон – перспективный криопротектор для криоконсервирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / А.И. Пономарев, А.В. Коротков // Актуальные вопросы современной медицинской

науки и здравоохранения: Материалы 65-й всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием. Екатеринбург, 14-15 апреля, 2010 г. – Екатеринбург, 2010. - С. 377-382.

3. Пономарев А.И. Инновационный криопротектор на основе ксенона / А.И. Пономарев // Тезисы докладов "Инновационные технологии в реальном секторе экономики", заседания экспертного совета по программе "УМНИК". Екатеринбург, 24-26 мая, 2010 г. – Екатеринбург, 2010. - С. 164-168.

4. Поиск эффективных способов и агентов криоконсервации клеток организма *in vitro* / А.И. Пономарев, Е.И. Довженко, П.А. Ошурков, В.В. Минин // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения. Материалы 66-й всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. Екатеринбург, 18-19 мая, 2011 г. – Екатеринбург, 2011. - С. 245-247.

5. Макеев О.Г. Применение клатратообразующего газа для разработки способа сберегающей криоконсервации стволовых клеток / О.Г. Макеев, А.И. Пономарев, А.В. Коротков // Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий: Материалы I Международной научно-практической конференции. Екатеринбург, 2011 г. – Москва, 2011. - С. 180-184.

6. **A study of the applicability of xenon clathrates for the preservation of human stem cells and skin fragments / A. Ponomarev, L. Gurevich, A. Zvereva, O. Makeev // Proceedings of the International Summer School on Application of Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Soft Matter and Nanofabrication", 2013. Access mode:**

http://vbn.aau.dk/files/176460988/School_2013_Abstract_Ponomarev_v3.pdf

7. **Hypothermic preservation of stem cells and tissues in xenon clathrates / A. Ponomarev, L. Gurevich, O. Makeev, A. Zvereva // Journal tissue engineering and regenerative medicine. – 2014. – Vol. 8, Suppl. 1. -P. 516-517.**

8. Исследования консервирующих свойств клатратов инертного газа ксенона на модели краткосрочного хранения кожных лоскутов / А.И. Пономарев, О.Г. Макеев,

А.Е. Зверева, А.В. Коротков // Сборник научных работ. Клеточные технологии практическому здравоохранению, 2014/, Екатеринбург, 2014, с 78-84.

9. **Применение клатратов ксенона для консервации кожи человека / А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. И. Зверева, А. В. Коротков // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. - №5. - С. 98-102.**

10. **Comparison of the viability indicators of xenon clathrate preserved skin and other preservation methods on the animal engraftment model / A. Ponomarev, M. Gerasimov, A. Korotkov, O. Makeev // Tissue engineering: Part A. – 2015. - Vol. 21, Suppl. 1. -P. 101.**

11. Пономарев А.И. Показатели эритроцитов, консервированных в гипербарической атмосфере ксенона / А. И. Пономарев, О. Г. Макеев, А. В. Коротков // Вестник уральского государственного медицинского университета. 2015. - №2-3 (29-30). – С. 247-252.

ПАТЕНТЫ

1. Пат. № 2433173 Российская Федерация, МПК А01N 1/02. Способ криоконсервации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / Макеев О.Г., Пономарев А.И., Коротков А.В.; № 2010122298/10; заявл. 06.01.2010 : опубл. 10.11.2011, Бюл. № 31.

2. Пат. № 149845 Российская Федерация, МПК А01N 1/02. Контейнер для консервации, хранения и транспортировки биоматериала / Пономарев А.И.; № 2014127395/13; заявл. 04.07.2014 : опубл. 20.01.2015 Бюл. № 2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Хе – ксенон

Эр – эритроциты

Нб - гемоглобин

ФК – фибробластоподобные клетки

ДМСО – диметилсульфоксид

ЦФДА-1 – раствор цитрата натрия, фосфатного буфера, декстрозы, аденина

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

ПОЛ - перекисное окисление липидов

Пономарев Александр Игоревич

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

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета
Д 208.102.03 ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России от 15 февраля 2016 г.