



ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРАХ НА СВОЙСТВА И МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ АРТЕРИЙ ПУПЛОЧНОГО КАНАТИКА

В. А. Брумберг, Т. А. Астрелина[✉], Т. Ф. Маливанова, И. В. Кобзева, Ю. Б. Сучкова, В. А. Никитина, Д. Ю. Усупжанова, В. А. Брунчуков, С. В. Лищук, П. С. Кызласов, А. А. Кажера, В. М. Трояков, А. С. Самойлов

ГНЦ ФМБЦ им А. И. Буназяна, г. Москва, Российская Федерация

✉ t_astrelina@mail.ru

Резюме

Цель исследования. Изучение влияния консервации с использованием различных криопротекторов на биомеханические свойства и морфологическую структуру артерий пупочного канатика (АПК).

Материалы и методы. Материалом для данной работы являлись 12 пупочных артерий, которые разбивали на 4 группы исследования: (1) нативные АПК – контроль без заморозки; (2) АПК замороженные в 5 % декстране с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО) до 10 % и 7,5 % человеческого сывороточного альбумина (ЧСА); (3) АПК замороженные в глицерине и (4) АПК замороженные в пропандиоле. Для всех групп были проведены морфологические и биомеханические исследования. Для обработки статистических данных использовали программу GraphPad Prism 9.2.0. Для поиска достоверных различий применяли дисперсионный анализ.

Результаты. Замораживание с использованием 5 % декстрана, 10 % ДМСО и 7,5 % альбумина человека не приводило к существенным изменениям морфологии сосудистой ткани по сравнению с контролем. В консервированной сосудистой ткани сохраняется умеренный уровень коллагена I типа независимо от способа консервации. Показано наличие статистически значимых различий между контрольными и замороженными АПК для модуля Юнга, данные выражали как медиану [25-й перцентиль; 75-й перцентиль] ($p < 0,05$; 6,9 [6,8; 7,0] для нативной артерии; 2,3 [2,0; 2,6] – для артерии консервированной с использованием декстрана, ДМСО и альбумина человека; 2,3 [1,4; 3,2] – для артерии консервированной в глицерине и 0,8 [0,6; 1,0] – в пропандиоле, соответственно).

Заключение. 1) Замораживание и хранение АПК при 5 % декстране, 10 % ДМСО и 7,5 % ЧСА не приводит к существенному изменению морфологии оболочек сосудов и ядер клеток; 2) Сохранность коллагена I типа по результатам ИГХ качественно снижена с условного показателя +2 до +1 для замороженных АПК по сравнению с контрольными; 3) Консервация приводит к достоверному снижению модуля упругости стенок АПК по сравнению с контрольными сосудами ($p < 0,05$).

Ключевые слова:

бесклеточный матрикс, консервация криопротекторах, консервирование сосудистых трансплантатов

Для корреспонденции:

Астрелина Татьяна Алексеевна – д.м.н., доцент, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Буназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация.

Адрес: 123098, Российская Федерация, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23

E-mail: t_astrelina@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>

SPIN: 3415-8023, AuthorID: 751902

ResearcherID: F-5439-2016

Scopus Authors ID: 6507311937

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Брумберг В. А., Астрелина Т. А., Маливанова Т. Ф., Кобзева И. В., Сучкова Ю. Б., Никитина В. А., Усупжанова Д. Ю., Брунчуков В. А., Лищук С. В., Кызласов П. С., Кажера А. А., Трояков В. М., Самойлов А. С. Влияние консервации в различных криопротекторах на свойства и морфологическую структуру артерий пупочного канатика. Исследования и практика в медицине. 2022; 9(3):106–116. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-3-8>

Статья поступила в редакцию 04.11.2021; одобрена после рецензирования 18.07.2022; принята к публикации 12.09.2022.

© Брумберг В. А., Астрелина Т. А., Маливанова Т. Ф., Кобзева И. В., Сучкова Ю. Б., Никитина В. А., Усупжанова Д. Ю., Брунчуков В. А., Лищук С. В., Кызласов П. С., Кажера А. А., Трояков В. М., Самойлов А. С., 2022.

THE EFFECT OF CONSERVATION IN VARIOUS CRYOPROTECTANTS ON THE PROPERTIES AND MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF THE UMBILICAL CORD ARTERIES

V. A. Brumberg, T. A. Astrelina✉, T. F. Malivanova, I. V. Kobzeva, Yu. B. Suchkova, V. A. Nikitina, D. Yu. Usupzhanova, V. A. Brunchukov, S. V. Lishchuk, P. S. Kyzlasov, A. A. Kazhera, V. M. Troyakov, A. S. Samoilov

A. I. Burnazyan SSC FMBC, Moscow, Russian Federation

✉ t_astrelina@mail.ru

Abstract

Purpose of the study. The aim of this work was to study the effect of conservation in various cryoprotectants on the biomechanical and morphological properties of the umbilical cord (UCA) arteries.

Materials and methods. The material for this work was 12 umbilical arteries, which were divided into 4 study groups: (1) native UCA – control without freezing; (2) APC frozen in 5 % dextran with the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) to 10 % and 7.5 % human serum albumin (HSA); (3) APC frozen in glycerin and (4) UCA frozen in propanediol. For all groups, morphological and biomechanical studies were carried out. The statistical data were processed using the GraphPad Prism 9.2.0 program. Analysis of variance was used to find significant differences.

Results. Freezing with 5 % dextran, 10 % DMSO and 7.5 % human albumin did not lead to significant changes in the morphology of vascular tissue compared to control. The conserved vascular tissue retains a moderate level of type I collagen, regardless of the method of conservation. The presence of statistically significant differences between the control and frozen UCAs was shown for Young's modulus ($p < 0.05$; 6.9 [6.8; 7.0] for the native artery; 2.3 [2.0; 2.6] for the artery preserved with the use of dextran, DMSO and human albumin; 2.3 [1.4; 3.2] for the artery preserved in glycerin and 0.8 [0.6; 1.0] – in propanediol, respectively).

Conclusion. 1) Freezing and storage of UCA at 5 % dextran, 10 % DMSO and 7.5 % HSA does not lead to a significant change in the morphology of vascular membranes and cell nuclei; 2) The preservation of type I collagen according to the results of IHC is qualitatively reduced from a conditional indicator of +2 to +1 for frozen agroindustrial complexes compared with control ones; 3) Conservation leads to a significant decrease in the modulus of elasticity of the walls of the agroindustrial complex compared with control vessels ($p < 0.05$).

Keywords:

acellular matrix, preservation with cryoprotectants, preservation of vascular grafts

For correspondence:

Tatyana A. Astrelina – Dr. Sci. (Med), associate professor, head of the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation.

Address: 23 Marshal Novikov str., Moscow 123098, Russian Federation

E-mail: t_astrelina@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>

SPIN: 3415-8023, AuthorID: 751902

ResearcherID: F-5439-2016

Scopus Authors ID: 6507311937

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Brumberg V. A., Astrelina T. A., Malivanova T. F., Kobzeva I. V., Suchkova Yu. B., Nikitina V. A., Usupzhanova D. Yu., Brunchukov V. A., Lishchuk S. V., Kyzlasov P. S., Kazhera A. A., Troyakov V. M., Samoilov A. S. The effect of conservation in various cryoprotectants on the properties and morphological structure of the umbilical cord arteries. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2022; 9(3): 106–116. (In Russ.). <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-3-8>

The article was submitted 04.11.2021; approved after reviewing 18.07.2022; accepted for publication 12.09.2022.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем в современной урологии, сосудистой хирургии является отсутствие функционально надежных трансплантатов, в том числе сосудистых протезов малого диаметра (не более 5 мм), необходимых для протезирования [1]. Примерно у 20 из 1000 человек возрастом более 65 лет ежегодно диагностируют то или иное заболевание кровеносных сосудов. Мировая потребность в протезах малого диаметра составляет около 450 000 шт. в год или примерно 70 % от всех протезов кровеносных сосудов [1]. Следует отметить, что рутинное использование в реконструктивной сосудистой хирургии недеградируемых синтетических сосудистых протезов, представленных политетрафторэтиленом (ПТФЭ) и терефталата полиэтилена (ПЭТ), для замещения крупных сосудов, приводит к успешным результатам трансплантации, что показано в ряде клинических исследований [2–5]; однако, применение подобных протезов для замещения сосудов малого диаметра приводит к осложнениям, в частности, к нарушениям проходимости в краткосрочном и отдалённом послеоперационном периоде. Аутологичные донорские сосудистые трансплантаты малого диаметра зачастую недоступны ввиду состояния пациента или проведения нескольких шунтирований.

Ввиду отсутствия достаточного количества донорских сосудистых трансплантатов применимых для протезирования сосудов малого диаметра высокую значимость приобретает создание банка сосудистых трансплантатов. Американской ассоциацией тканевых банков (AATB) разработаны определения, стандарты и протоколы изъятия, обработки, маркирования хранения и криоконсервации тканевых трансплантатов, которые являются стандартом для всех тканевых биобанков [6]. В настоящее время наиболее известными тканевыми биобанками являются: Европейский банк гомографтов, г. Брюссель; Национальный банк сердечно-сосудистых гомографтов, г. Сингапур; Банк внутренних органов, г. Саутбанк, Австралия; Банк тканей при университете Градец –Кралоуе, Чехия и ряд других.

Следует отметить, что в России в настоящее время обработка и хранение аллогенных тканей ведётся всего в нескольких учреждениях, а развитие тканевых банков затруднено из-за отсутствия адекватной нормативно-правовой базы [7]. Кроме того, актуальны также научные исследования в этой области, поскольку необходимы такие протоколы обработки, хранения и криоконсервации сосудистых трансплантатов, которые обеспечивали бы стерильность биоматериала, сохранение его морфологических и функциональных свойств, отсутствие тромбген-

ного потенциала. Отдельно следует подчеркнуть, что консервация с использованием доведённого до –800С жидкого азота и последующее хранение при этой температуре способствует, по данным некоторых авторов [8], потенциальной тромбогенности сосудистых трансплантатов.

Таким образом, учитывая востребованность трансплантатов в хирургии и трансплантологии, а также статистику по смертности населения РФ от сердечно-сосудистых заболеваний [7], проведение научных исследований консервирования сосудистых трансплантатов становится крайне важной научной задачей.

Цель исследования: изучение влияния консервации артерий пупочного канатика с использованием различных криопротекторов на их морфологические и упруго-прочностные свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение артерий пупочного канатика

В качестве тканевых трансплантатов использовали артерии пупочного канатика (АПК). Для выделения АПК использовали плаценты, изъятые после кесарева сечения, полученные вместе с пупочными канатиками от одноплодных беременностей на доношенном сроке (38–40 недель) с информированного согласия рожениц. С целью получения артерий пупочного канатика изымали фрагменты пуповины длиной от 3 до 7 см, удаляли слизистую соединительную ткань с помощью офтальмологических ножниц. Далее свободную от вартонова студня артерию промывали троекратно 1х фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) (Gibco, США) с добавлением 1 мг/мл цефазолина (ПАО «Красфарма», Россия) и 50 МЕ/мл гепарина (ОАО «Синтез», Россия) с использованием тупого периферического венозного катетера 22G (0,6 мм). Аналогичным образом промывали вторую пупочную артерию. Всего выделили 12 артерий от 6 пупочных канатиков.

Консервирование артерий пупочного канатика

Изолированные АПК ($n = 12$) делили на следующие группы, по три сосуда в каждой: (1) нативные АПК – незамороженные контроли; (2) АПК, замороженные с использованием 5 % декстрана 30 000–40 000 (ООО «Ист-Фарм», Россия), 7,5 % альбумина человека (АО «НПО» «Микроген», Россия) и 10 % DMSO (AppliChem, Германия); (3) АПК замороженные в глицерине; (4) АПК замороженные в пропандиоле.

АПК всех групп кроме первой замораживали с использованием EVA – мешков для замораживания крови и её компонентов Origen Cryostore CS500N (Origen Biomedical, Германия), которые герметизировали с использованием запаивателя Hemofreeze Sealer (Fresenius Kabi, Германия). Мешки для заморозки за-

полняли криопротекторами, затем герметизировали магистраль мешков с использованием переносного запаивателя Baxter Hematron III (Baxter Healthcare, США). АПК эквilibрировали при температуре +4 °C на 15 мин для насыщения ткани криопротекторами. Затем каждый мешок маркировали этикеткой со штрих-кодом, помещали в низкотемпературный холодильник и хранили при –80 °C.

Морфологическое исследование, а также оценку упруго-прочностных свойств проводили для всех артерий четырёх групп.

Гистологическое окрашивание нативных и замороженных артерий пупочного канатика

Для морфологического исследования фрагменты нативных и замороженных АПК фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия). Далее после проведения в спиртах восходящей концентрации и заливки в парафин приготовленные срезы депарафинизировали в ксилоле и проводили в растворах этилового спирта нисходящей концентрации. Образцы стандартно окрашивали гематоксилином и эозином для общей оценки препарата и визуализации ядер клеток. Первичный анализ изображения проводили с использованием микроскопа Carl Zeiss Axiovert Imager 2.0 (Carl Zeiss, Германия) с объективом $\times 20$. С помощью сканера гистологических стёкол Ventana iScan HT (Roche Diagnostics, Швейцария) получали сканированные изображения препаратов в высоком разрешении.

Качественная оценка сохранности коллагена I типа после замораживания, хранения и размораживания АПК

С целью качественной оценки сохранности коллагена I типа после замораживания, хранения и размораживания АПК проводили иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с использованием первичных кроличьих поликлональных антител к коллагену I типа (1:200, #PA1–26204, ThermoFisher, США), вторичных козьих к IgG кролика, конъюгированных с HRP (#31460, ThermoFisher, США) и набора для детекции Pierce Peroxidase IHC Detection Kit (ThermoFisher, США). Блокирование активности эндогенной пероксидазы, окрашивание, промывание и контрастирование гематоксилином Харриса проводили в соответствии с инструкцией к набору. Визуализацию окрашенных срезов проводили с использованием прямого микроскопа Carl Zeiss Axiovert (Carl Zeiss, Германия) под увеличениями $\times 5$ – $\times 20$. Сканированные изображения препаратов в высоком разрешении получали при увеличении $\times 20$ с использованием сканера гистологических стёкол Ventana iScan HT (Roche Diagnostics, Швейцария).

Распределение коллагена I в толще сосудистой стенки оценивали качественным методом по сле-

дующим показателям: 0 – отсутствие коллагена вдоль интимы и на протяжении средней оболочки, 1 – наличие тонкой полоски коллагена вдоль интимы и слабое окрашивание во всей толще средней оболочки; 2 – толстая полоска коллагена вдоль интимы и средней оболочки.

Исследование упруго-прочностных свойств нативных и замороженных артерий пупочного канатика

Оценку биомеханических свойств нативных и замороженных артерий проводили с использованием разрывной машины Instron (Instron, США) в термостатической камере BioPuls. Оценку биомеханических свойств проводили по методике Лаука–Дубицкого С. Е. [9]. Оценивали модуль Юнга (Е, МПа), предельное напряжение (σ , МПа) при разрыве и предельную деформацию (ϵ , %). В качестве жидкой среды в камере использовали 0,9 % NaCl, испытания проводили при 37 °C. Образцы закрепляли в пневматических зажимах и погружали в 0,9 % NaCl. Регистрация проводилась при помощи датчика с диапазоном измерений 0–10 Н. В ходе испытания регистрировали зависимость усилия от удлинения образца. В ходе обработки полученных данных в ПО Matlab проводили расчет зависимости напряжения, возникающего в сосуде, от его относительной деформации, исходя из средней толщины образца. По графику «напряжение – деформация» определяли значения относительной деформации на физиологическом и хирургическом уровнях.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.2.0. Различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных групповых сравнений. Данные выразили как медиану [25-й перцентиль; 75-й перцентиль], при этом медиану и перцентили находили с помощью непарного теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты рутинного гистологического исследования нативной и замороженных артерий пупочного канатика с окрашиванием гематоксилином-эозином представлены на рисунке 1.

При анализе изображений гистологических препаратов нативной и замороженных артерий пупочного канатика видно, что замораживание с использованием 5 % декстрана, 10 % ДМСО и 7,5 % альбумина человека с последующим хранением при –80 °C не приводило к существенным изменениям морфологии сосудистой ткани по сравнению с незамороженным нативным контролем. Гистологические препараты

артерий пупочного канатика, замороженных в глицерине и пропандиоле характеризуются некрозом интимы, наличием пикнотических ядер наряду с разволокнением соединительнотканного матрикса (рис. 1).

Результаты иммуногистохимического исследования (ИГХ) нативной и замороженных АПК с поликлональными антителами на коллаген I типа с использованием диаминобензидина (DAB) в качестве субстрата приведены на рисунке 2.

По результатам хромогенного ИГХ исследования с первичными антителами к коллагену I типа можно заключить, что на фиксированных срезах консервированной сосудистой ткани наблюдается умеренная интенсивность хромогенного окрашивания на коллаген I типа, соответствующая условному показателю +1. Однако консервация приводит к снижению интенсивности окрашивания по сравнению со срезами нативной незамороженной сосудистой ткани, индекс окрашивания срезов которой составляет +2 (рис. 2).

Результаты оценки упруго-прочностных свойств нативных и замороженных АПК представлены в таблице 1.

Различия в упруго-прочностных параметрах между нативными и замороженными артериями пупочного канатика оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного теста Тьюки для множественных групповых сравнений (рис. 3).

Консервация артерии пупочного канатика с использованием любого из описанных способов приводит к достоверному снижению значения модуля Юнга (медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль) (6,9 [6,8; 7,0] для нативной артерии; 2,3 [2,0; 2,6] – для артерии консервированной с использованием декстрана, ДМСО и альбумина человека; 2,3 [1,4; 3,2] – для артерии консервированной в глицерине и 0,8 [0,6; 1,0] – в пропандиоле (рис. 3).

Предельное напряжение в точке разрыва достоверно ниже при консервации в пропандиоле по срав-

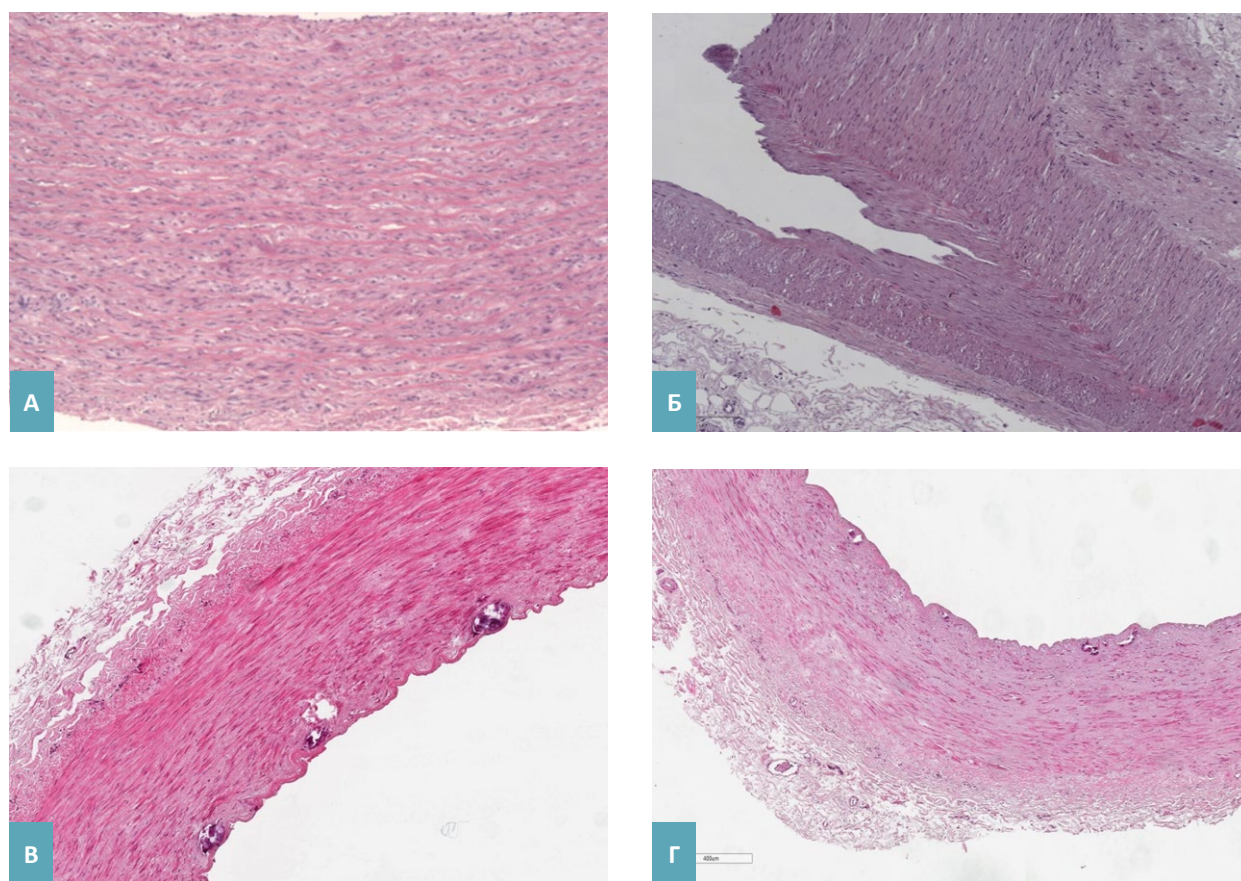


Рис. 1. Патоморфологическое исследование нативных и замороженных АПК. А – нативная артерия, $\times 20$; Б – артерия замороженная в 5 % декстране 30000–40000, 7,5 % альбумин человека и 10 % ДМСО, $\times 20$; В – артерия замороженная в глицерине, $\times 10$; Г – артерия замороженная в пропандиоле, $\times 10$.

Fig. 1. Pathomorphological study of native and frozen UCAs. A – native artery, $\times 20$; B – artery frozen in 5 % dextran 30000–40000, 7.5 % human albumin and 10% DMSO, $\times 20$; C – artery frozen in glycerin, $\times 10$; D – artery frozen in propanediol, $\times 10$.

нению с нативным сосудом (1,3 [1,1; 1,5] и 0,5 [0,4; 0,6]) в то время, как два других способа консервации не влияют на предельное напряжение в точке раз-

рыва. Кроме того, консервация с использованием различных криопротекторов не оказывает значимого эффекта на предельную деформацию при разрыве.

Таблица 1. Оценка биомеханических свойств нативных и замороженных АПК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$)

Table 1. Assessment of biomechanical properties of native and frozen UCAs. The data is presented as an average $\pm$ standard error of the mean ($M \pm m$)

	Модуль Юнга E, МПа / E Young's module	Предельное напряжение при разрыве σ , МПа / Breaking stress limit σ , МПа	Предельная деформация ϵ_{σ} , % / Limit deformation ϵ_{σ} , %
Нативные АПК / Native UCA	6,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	46,85 $\pm$ 5,75
АПК DMSO альбумин декстран / UCA DMSO albumin dextran	2,3 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,1	102,45 $\pm$ 10,35
АПК пропандиол / UCA propanediol	0,8 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
АПК глицерин / UCA glycerin	2,3 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,1	86,50 $\pm$ 31,5

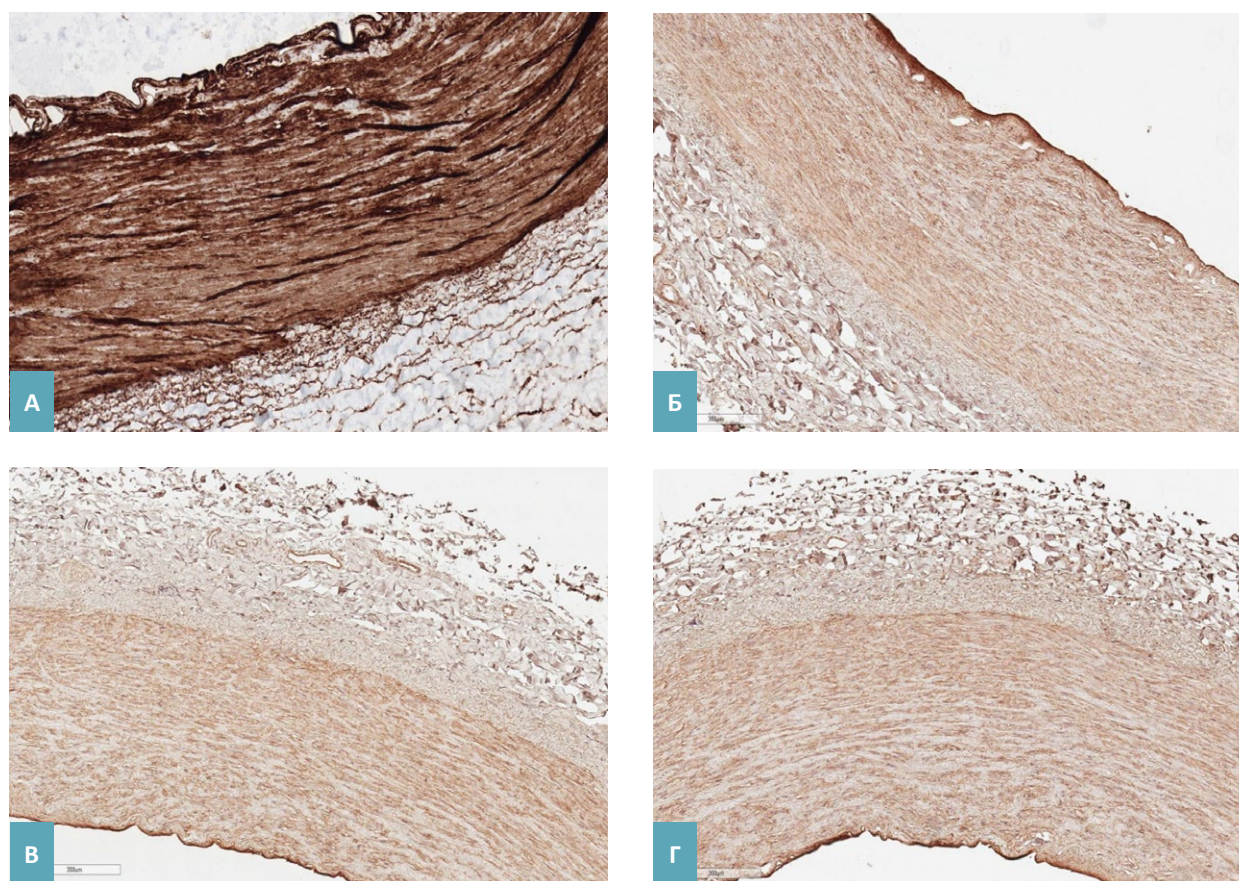


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование нативной и консервированных АПК с использованием пероксидазы хрена и диаминбензидина (DAB) в качестве субстрата реакции с антителами к коллагену I. А – нативная артерия, $\times 20$; Б – артерия замороженная в декстране, DMSO с добавлением альбумина человека, $\times 20$; В – артерия, замороженная в глицерине, $\times 20$; Г – артерия, замороженная в пропандиоле, $\times 10$.

Fig. 2. Immunohistochemical study of native and canned UCA using horseradish peroxidase and diaminobenzidine (DAB) as a reaction substrate with antibodies to collagen type I. A – native artery, $\times 20$; B – artery frozen in dextran, DMSO with the addition of human albumin, $\times 20$; C – artery frozen in glycerin, $\times 20$; D – artery frozen in propanediol, $\times 10$.

Таким образом, можно заключить, что результаты исследования упруго-прочностных свойств показали наличие статистически значимой разницы между нативными и замороженными артериями пупочного канатика по модулю Юнга ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматриваемый в работе способ консервации сосудистой ткани с использованием проникающего (ДМСО) и непроникающего (декстран) криопротекторов часто применяется в тканевых банках с теми или иными модификациями. Так, например, в тканевом банке при Европейском университете Градец – Кралове сосудистые трансплантаты после деконтаминации помещают в пластиковые EVA мешки и замораживают с использованием непроникающего криопротектора 6 % гидроксиэтилкрахмала и 20 % ДМСО, 1:1, с исполь-

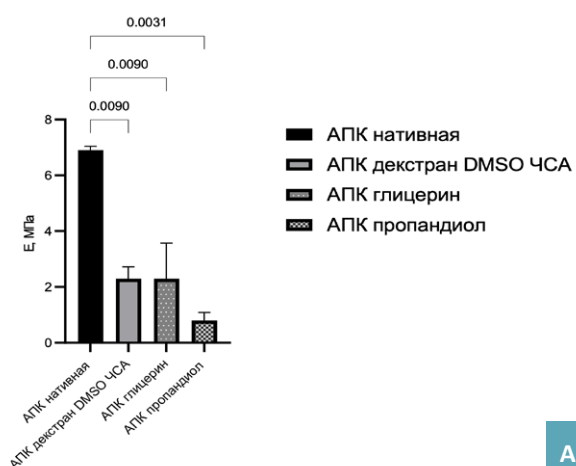
зованием программного метода и хранят в парах жидкого азота [10]. Аналогичный способ консервации используют и Национальном тканевом банке Сингапура с той разницей, что криоконсервацию проводят с использованием 10 % ДМСО в среде M199 [11].

Относительно сосудов пупочного канатика следует отметить, что, в случаях, если сохранность и жизнеспособность клеточного компонента не является приоритетной, то замораживают в 20 объемах (от объема образца) изотонического раствора [12], однако, существуют работы, в которых изучали эффект криоконсервации с использованием 10 % ДМСО и 5 % глицерина на выживаемость клеток пуповины [13].

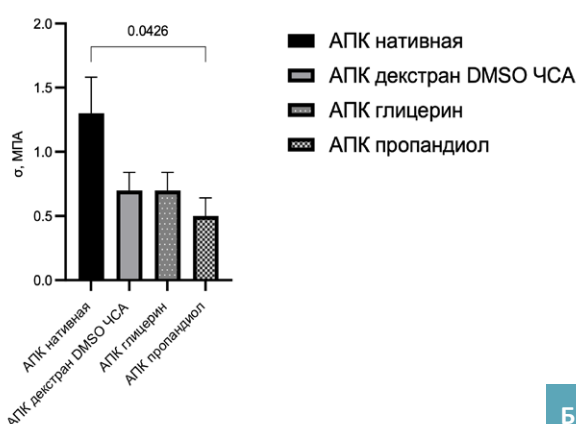
Консервация с использованием глицерина используется для аллотрансплантатов кожи и сосудов: так, например, в тканевом банке при университетском госпитале в Сиене, Италия [14] кожные лоскуты замораживают в DMEM с 15 % ДМСО с добавлением пенициллина-стрептомицина, гентамицина сульфата и амфотерицина В.

Несмотря на отсутствие данных об использовании в тканевых банках пропандиола как криопротектора, тем не менее его применяют в научных исследованиях для замораживания тканей. Например, Боброва Е. Н. с соавт. (2005) сравнивали эффект насыщения тканей плаценты для 10 %, 40 и 60 % растворов пропандиола и глицерина с помощью методов ядерно-магнитного резонанса и сканирующей калориметрии. Авторами была показана более высокая эффективность пропандиола как проникающего криопротектора по сравнению с глицерином [15].

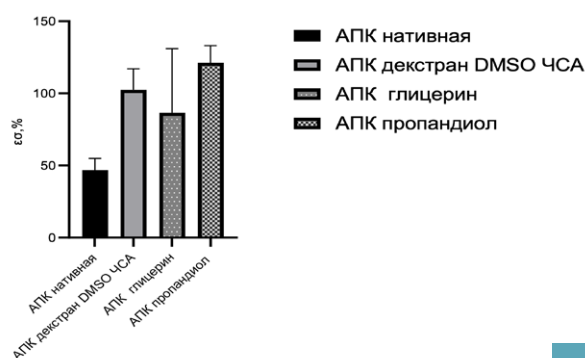
В нашей работе показано, что замораживание артерий пупочного канатика с использованием 5 % декстрана, 10 % ДМСО и 7,5 % альбумина человека



А



Б



В

Рис. 3. Множественные парные групповые сравнения по: А – модулю Юнга между контрольной (нативная артерия) и опытными (артерии, консервированные с использованием различных криопротекторов) группами; Б – по предельному напряжению в точке разрыва; В – по предельной деформации в точке разрыва. Обозначены парные сравнения со значимыми разностями групповых средних.

Fig. 3. Multiple paired group comparisons by: А – Young's modulus between the control (native artery) and experimental (arteries preserved using various cryoprotectors) groups; Б – by the ultimate stress at the point of rupture; В – by the ultimate deformation at the point of rupture. Paired comparisons with significant differences of group averages are indicated.

с последующим хранением при -80°C не приводит к существенным изменениям морфологии оболочек сосудов. Замораживание артерий пупочного канатика с использованием глицерина или пропандиола (3 и 4 группы) способствует некрозу интимы и отслоению адвентиции (рис. 1В, Г). Можно заключить, что однократное замораживание в 5 % декстрате, 10 % ДМСО и 7,5 % альбумине оказывает наиболее щадящее действие на морфологию сосудистой стенки по сравнению с глицерином или пропандиолом.

Что касается оценки упругости и прочности замороженных и нативных АПК, наше исследование показало, что состав криопротекторов не влияет существенно на предельную деформацию при разрыве и предельное напряжение в точке разрыва, однако приводит к существенному падению модуля Юнга или к снижению эластичности, что соответствует литературным данным [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обобщая полученные результаты настоящего исследования, можно сделать следующие выводы:

1. Замораживание и хранение АПК при -80°C в 5 % декстрате, 10 % ДМСО и 7,5 % человеческого сывороточного альбумина не приводит к существенному изменению морфологии оболочек сосудов и ядер клеток, что не наблюдается при замораживании в глицерине и пропандиоле;

2. Сохранность коллагена I типа качественно снижена с +2 до +1 для замороженных артерий пупочного канатика по сравнению с контрольными, о чём косвенно свидетельствует результат иммуногистохимического исследования с поликлональными антителами к коллагену I типа;

3. Консервация и хранение при -80°C приводят к достоверному снижению модуля упругости стенок артерий пупочного канатика по сравнению с нативными сосудами;

4. Достоверной разницы по модулю Юнга между группами замороженных артерий пупочного канатика не выявлено. Это свидетельствует о том, что состав применяемых криопротекторов не оказывает влияния на упруго-прочностные свойства сосудистой стенки, однако сам способ консервации влияет на данные свойства.

Список источников

1. Антонова Л. В., Насонова М. В., Кудрявцева Ю. А., Головкин А. С. Возможности использования полиоксикалкоанатов и полипропалактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии. Бюллетень сибирской медицины. 2012;11(1):128–134. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2012-1-128-134>
2. Obiweleuzor FO, Emechebe GA, Kim DW, Cho HJ, Park CH, Kim CS, et al. Considerations in the Development of Small-Diameter Vascular Graft as an Alternative for Bypass and Reconstructive Surgeries: A Review. Cardiovasc Eng Technol. 2020 Oct;11(5):495–521. <https://doi.org/10.1007/s13239-020-00482-y>
3. Mallis P, Kostakis A, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. Bioengineering (Basel). 2020 Dec 10;7(4):160. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040160>
4. Roll S, Müller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, et al. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery—systematic review and meta-analysis. BMC Surg. 2008 Dec 19;8:22. <https://doi.org/10.1186/1471-2482-8-22>
5. Ingle H, Fishwick G, Garnham A, Thompson MM, Bell PRF. Long-term results of endovascular AAA repair using a homemade aorto-monolilac PTFE device. J Endovasc Ther. 2002 Aug;9(4):481–487. <https://doi.org/10.1177/152660280200900416>
6. Moore MA, Samsell BS, McLean J. Allograft Tissue Safety and Technology. Biologics in Orthopaedic Surgery. 2019:49–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55140-3.00005-9>
7. Миронов А. С., Боровкова Н. В., Макаров М. С., Пономарев И. Н., Андреев Ю. В. Банки тканей. Мировой опыт. История развития и современные подходы. Трансплантология. 2021;13(1):49–62. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2021-13-1-49-62>
8. Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolova N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. PLoS One. 2021;16(7):e0255114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>
9. Лаук-Дубицкий С. Е., Астрелина Т. А., Брумберг В. А., Федюнин А. А., Камышников О. Ю., Вострухин С. В. И др. Оценка применения полидиметилсилоксана низкой вязкости для криоконсервации и радиационной стерилизации сосудистых аллогraftов человека. Саратовский научно-медицинский журнал. 2016;12(4):662–670.
10. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádlér P, Adamec M, Vlachovský R, et al. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. Adv Clin Exp Med. 2019 Apr;28(4):529–534. <https://doi.org/10.17219/acem/90037>
11. Heng WL, Madhavan K, Wee P, Seck T, Lim YP, Lim CH. Banking of cryopreserved iliac artery and vein homografts: clinical uses in transplantation. Cell Tissue Bank. 2015 Jun;16(2):235–242. <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9469-2>
12. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. Stem Cell Res Ther. 2018 Sep 15;9(1):236. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0992-0>

13. Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, et al. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014 Dec;54(12):3108–3120. <https://doi.org/10.1111/trf.12743>
14. Tognetti L, Pianigiani E, Ierardi F, Mariotti G, Perotti R, Lonardo A, et al. Current insights into skin banking: storage, preservation and clinical importance of skin allografts. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 2017 Jul 1;Volume 5:41–56. <https://doi.org/10.2147/BSAM.S115187>
15. Bobrova EN, Zinchenko AV, Schetinsky MI. Investigation of Placenta Tissue Saturation with Glycerol and 1,2-Propane Diol. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2005 Jun 15;15(2):147–152.
16. Camasão DB, Mantovani D. The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. *Mater Today Bio*. 2021 Mar 7;10:100106. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100106>

References

1. Antonova LV, Nasonova MV, Kudryavtseva YuA, Golovkin AS. Potential for polyhydroxyalkanoates and polycaprolactone copolymer use as tissue-engineered scaffolds in cardiovascular surgery. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2012;11(1):128–134. (In Russ.). <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2012-1-128-134>
2. Obiweleuzor FO, Emechebe GA, Kim DW, Cho HJ, Park CH, Kim CS, et al. Considerations in the Development of Small-Diameter Vascular Graft as an Alternative for Bypass and Reconstructive Surgeries: A Review. *Cardiovasc Eng Technol*. 2020 Oct;11(5):495–521. <https://doi.org/10.1007/s13239-020-00482-y>
3. Mallis P, Kostakis A, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering (Basel)*. 2020 Dec 10;7(4):160. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040160>
4. Roll S, Müller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, et al. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. *BMC Surg*. 2008 Dec 19;8:22. <https://doi.org/10.1186/1471-2482-8-22>
5. Ingle H, Fishwick G, Garnham A, Thompson MM, Bell PRF. Long-term results of endovascular AAA repair using a homemade aorto-monoiliac PTFE device. *J Endovasc Ther*. 2002 Aug;9(4):481–487. <https://doi.org/10.1177/152660280200900416>
6. Moore MA, Samsell BS, McLean J. Allograft Tissue Safety and Technology. *Biologics in Orthopaedic Surgery*. 2019:49–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55140-3.00005-9>
7. Mironov AS, Borovkova NV, Makarov MS, Ponomarev IN, Andreev YuV. Tissue banks. World experience. The history of development and current approaches. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2021;13(1):49–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2021-13-1-49-62>
8. Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikolova N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One*. 2021;16(7):e0255114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>
9. Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, Brumberg VA, Fedyunin AA, Kamysnikov OYu, Vostrukhin SV, et al. Application evaluation of a polydimethylsiloxane low-viscosity for cryopreservation and radiation sterilization of human cadaveric vascular allografts. *Saratov Scientific and Medical Journal*. 2016;12(4):662–670. (In Russ.).
10. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádler P, Adamec M, Vlachovský R, et al. Current vascular allograft procurement, cryopreservation and transplantation techniques in the Czech Republic. *Adv Clin Exp Med*. 2019 Apr;28(4):529–534. <https://doi.org/10.17219/acem/90037>
11. Heng WL, Madhavan K, Wee P, Seck T, Lim YP, Lim CH. Banking of cryopreserved iliac artery and vein homografts: clinical uses in transplantation. *Cell Tissue Bank*. 2015 Jun;16(2):235–242. <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9469-2>
12. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Sep 15;9(1):236. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0992-0>
13. Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, et al. Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014 Dec;54(12):3108–3120. <https://doi.org/10.1111/trf.12743>
14. Tognetti L, Pianigiani E, Ierardi F, Mariotti G, Perotti R, Lonardo A, et al. Current insights into skin banking: storage, preservation and clinical importance of skin allografts. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 2017 Jul 1;Volume 5:41–56. <https://doi.org/10.2147/BSAM.S115187>
15. Bobrova EN, Zinchenko AV, Schetinsky MI. Investigation of Placenta Tissue Saturation with Glycerol and 1,2-Propane Diol. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2005 Jun 15;15(2):147–152.
16. Camasão DB, Mantovani D. The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. *Mater Today Bio*. 2021 Mar 7;10:100106. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100106>

Информация об авторах:

Брумберг Валентин Андреевич – научный сотрудник лаборатории редактирования генома Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. SPIN: 7842-7557, AuthorID: 1063299, Scopus Authors ID: 57200660067

Астрелина Татьяна Алексеевна – д.м.н., доцент, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>, SPIN: 3415-8023, AuthorID: 751902, ResearcherID: F-5439-2016, Scopus Authors ID: 6507311937

Маливанова Татьяна Федоровна – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редактирования генома Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9699-2603>, SPIN: 8977-6508, AuthorID: 82965, Scopus Author ID: 6602512746

Кобзева Ирина Владимировна – к.м.н., заведующая криобанка Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1499-8954>, SPIN: 6651-6128, AuthorID: 344864, Scopus Authors ID: 55263733600

Сучкова Юлия Борисовна – к.м.н., заведующая специализированной лаборатории цитологии, генетики и иммунологии Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9651-1937>, SPIN: 7187-8520, AuthorID: 542368, Scopus Author ID: 57193077251

Никитина Виктория Андреевна – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории №9 Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3150-7686>, SPIN: 5065-5361, AuthorID: 97400, ResearcherID: D-3116-2012, Scopus Author ID: 7006593953

Усупжанова Дарья Юрьевна – младший научный сотрудник лаборатории №1 Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3894-7182>, Scopus Authors ID: 57193074639

Брунчуков Виталий Андреевич – младший научный сотрудник лаборатории редактирования генома Центра биомедицинских и аддитивных технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-5524>, SPIN: 2464-2609, AuthorID: 999246, Scopus Authors ID: 57197866585

Лищук Сергей Владимирович – к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0372-5886>, SPIN: 7171-5402, AuthorID: 970949, Scopus Author ID: 52563982300

Кызласов Павел Сергеевич – д.м.н., руководитель Центра урологии и андрологии, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. SPIN: 6806-7913, AuthorID: 615093

Кажера Анастасия Андреевна – врач-уролог Центра урологии и андрологии, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4108-4066>, SPIN: 5053-0440, AuthorID: 1060704

Трояков Владислав Маратович – аспирант кафедры урологии и андрологии МБУ ИНО, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6216-4954>

Самойлов Александр Сергеевич – чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4824-5683>, SPIN: 3771-4848, AuthorID: 738843, Scopus Authors ID: 57194187432

Information about authors:

Valentin A. Brumberg – researcher at the genome editing laboratory of the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. SPIN: 7842-7557, AuthorID: 1063299, Scopus Authors ID: 57200660067

Tatyana A. Astrelina – Dr. Sci. (Med), associate professor, head of the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3629-0372>, SPIN: 3415-8023, AuthorID: 751902, ResearcherID: F-5439-2016, Scopus Authors ID: 6507311937

Tatyana F. Malivanova – Cand. Sci. (Med), senior researcher at the genome editing laboratory of the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9699-2603>, SPIN: 8977-6508, AuthorID: 82965, Scopus Author ID: 6602512746

Irina V. Kobzeva – Cand. Sci. (Med), head of the cryobank at the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1499-8954>, SPIN: 6651-6128, AuthorID: 344864, Scopus Authors ID: 55263733600

Yulia B. Suchkova – Cand. Sci. (Med), head of the specialized laboratory of cytology, genetics and immunology of the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9651-1937>, SPIN: 7187-8520, AuthorID: 542368, Scopus Author ID: 57193077251

Victoria A. Nikitina – Cand. Sci. (Med), leading researcher of laboratory No. 9 at the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3150-7686>, SPIN: 5065-5361, AuthorID: 97400, ResearcherID: D-3116-2012, Scopus Author ID: 7006593953

Daria Yu. Usupzhanova – junior researcher of laboratory No. 1 at the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3894-7182>, Scopus Authors ID: 57193074639

Vitaliy A. Brunchukov – junior researcher at the genome editing laboratory of the center for biomedical and additive technologies, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-5524>, SPIN: 2464-2609, AuthorID: 999246, Scopus Authors ID: 57197866585

Sergey V. Lishchuk – Cand. Sci. (Med), head at the pathology department, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0372-5886>, SPIN: 7171-5402, AuthorID: 970949, Scopus Author ID: 52563982300

Pavel S. Kyzlasov – Dr. Sci. (Med), head at the Center of Urology and Andrology, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. SPIN: 6806-7913, AuthorID: 615093

Anastasia A. Kazhera – MD, urologist at the Center of Urology and Andrology, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4108-4066>, SPIN: 5053-0440, AuthorID: 1060704

Vladislav M. Troyakov – postgraduate student at the department of Urology and Andrology of MBU INO, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6216-4954>

Alexander S. Samoilov – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med), professor, general director, A. I. Burnazyan SSC FMBC of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4824-5683>, SPIN: 3771-4848, AuthorID: 738843, Scopus Authors ID: 57194187432

Вклад авторов:

Брумберг В. А. – 10 % анализ данных, написание текста;
Астрелина Т. А. – 10 % анализ данных, организация;
Маливанова Т. Ф. – 10 % участие в разработке;
Кобзева И. В. – 10 % участие в разработке;
Сучкова Ю. Б. – 10 % участие в разработке;
Никитина В. А. – 10 % участие в разработке;
Усупжанова Д. Ю. – 5 % хирургический этап;
Брунчуков В. А. – 5 % хирургический этап;
Лещук С. В. – 10 % гистологическое и иммуногистохимическое исследование;
Кызласов П. С. – 5 % хирургический этап, организация;
Кажера А. А. – 5 % хирургический этап, написание текста;
Трояков В. М. – 5 % анализ данных, написание текста;
Самойлов А. С. – 5 % организация, контроль руководства.

Authors contribution:

Brumberg V. A. – 10 % data analysis, text writing;
Astrelina T. A. – 10 % data analysis, organization;
Malivanova T. F. – 10 % participation in the development;
Kobzeva I. V. – 10 % participation in the development;
Suchkova Y. B. – 10 % participation in the development;
Nikitina V. A. – 10 % participation in the development;
Yusupdzhanova D. Yu. – 5 % surgical stage;
Brunchukov V. A. – 5 % surgical stage;
Lishchuk S. V. – 10 % histological and immunohistochemical examination;
Kyzlasov P. S. – 5 % surgical stage, organization;
Kazhera A. A. – 5 % surgical stage, text writing;
Troyakov V. M. – 5 % data analysis, text writing;
Samoilov A. S. – 5 % organization, management control.