

РФП является актуальной задачей для нашей страны в связи с интенсивным развитием и открытием ПЭТ-центров в России. Применение ^{68}Ga -меченных препаратов для визуализации костных патологий наряду с натрия фторидом-18 отвечает заявленным требованиям современной ядерной медицины, связанным с оценкой патофизиологических изменений и отражением функционального статуса в поврежденных органах и тканях на ранней стадии развития процесса.

Конфликт интересов. Исследование выполнено в рамках доклинических испытаний радиофармацевтических препаратов Na^{18}F и «Оксабигал, ^{68}Ga ».

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования, утверждение рукописи для публикации — О. Е. Клементьева; получение данных — А. С. Лунёв, К. А. Лунёва, М. В. Жукова, А. О. Малышева; обработка данных — А. С. Лунёв, К. А. Лунёва; анализ и интерпретация результатов — А. С. Лунёв, К. А. Лунёва; написание статьи — А. С. Лунёв, К. А. Лунёва, О. Е. Клементьева.

References (Литература)

1. Modnikov OP, Novikov GA, Rodionov VV. Bone metastases of breast cancer: pathogenesis, clinics, diagnostics and treatment. Moscow, 2001; 256 p. Russian (Модников О. П., Новиков Г. А., Родионов В. В. Костные метастазы рака молочной железы: патогенез, клиника, диагностика и лечение: руководство для врачей. М., 2001, 256 с.).
2. Rybak LD, Rosental DI. Radiological imaging for the diagnosis of bone metastases. Q J Nucl Med 2001; 45: 53–64.
3. Uchida N, Sugimura K, Kajitani A, Yoshizako T, Ishida T. MR imaging of vertebral metastases: evaluation of fat saturation imaging. Eur J Radiol 1993; 17: 91–94.
4. Harbert JC, Eckelman WC, Neumann RD. Nuclear Medicine: Diagnosis and Therapy. New York: Thieme Medical Publishers Inc, 1996.
5. Mc Afee G. Tc-99m-methylenediphosphonate — a superior agent for skeletal imaging: comparison with other technetium complexes. J Nucl Med 1975; 16: 744.
6. Ebetino FH, Barnett BL, Russell RGG. A computational model delineates differences in hydroxyapatite binding affinities of bisphosphonate. J Bone Miner Res 2005; 20 (1): 259.
7. Blau M, Ganatra R, Bender MA. ^{18}F -Fluoride for bone imaging. Semin Nucl Med 1972; 2: 31–37.
8. Bateman TM. Advantage and disadvantages of PET and SPECT in a busy clinical practice. J Nucl Cardiol 2012; 19 (2): 3–11.
9. Grant FD, Fahey FH, Packard AB, Davis RT, Alavi A, Treves ST. Skeletal PET with ^{18}F -Fluoride: Applying New Technology to an Old Tracer. J Nucl Med 2008; 49: 68–78.
10. Breeman WAP, Verbruggen AM. The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator has high potential, but when can we use ^{68}Ga -labelled tracer in clinical routine? Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007; 34: 978–81.
11. Fellner M, Baum RP, Kubicek V. PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010; 37: 834–834.
12. Suzuki K, Satake M, Suwada J. Synthesis and evaluation of a novel ^{68}Ga -chelate-conjugated bisphosphonate as a bone-seeking agent for PET imaging. Nucl Med Biol 2011; 38 (7):1011–8.
13. Ogawa K, Takai K, Kanbara H. Preparation and evaluation of a radiogallium complex-conjugated bisphosphonate as a bone scintigraphy agent. Nucl Med Biol 2011; 38: 631–6.
14. Goulet RT, Shysh A, Noujaim AA, Lentle BC. Investigation of ^{68}Ga tripolyphosphate as a potential bone scanning agent. Int J App Rad and Isotopes 1975; 26 (4): 195–9.
15. Patent RU No 2522892. Russian (Патент РФ № 2522892).
16. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. Proc Nat Acad Sci USA 2000; 97: 9226–33.
17. Herschman HR, MacLaren DC, Iyer M. Seeing is believing: non-invasive, quantitative and repetitive imaging of reporter gene expression in living animals, using positron emission tomography. J Neuro Sci Res 2000; 59: 699–705.

УДК 57.043,57.085.23,57.086.13,577.34

Оригинальная статья

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА КОМПЛЕКСНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ МАТРИКСОВ

С. Е. Лаук-Дубицкий — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, биолог специализированной лаборатории цитологии, генетики и иммунологии; **Т. А. Астрелина** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, руководитель Центра биомедицинских технологий, доктор медицинских наук; **В. А. Брумберг** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, младший научный сотрудник специализированной лаборатории цитологии, генетики и иммунологии; **В. А. Никитина** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, биолог криобанка Центра биомедицинских технологий, кандидат медицинских наук; **Ю. Б. Сучкова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, младший научный сотрудник лаборатории №1 Центра биомедицинских технологий, кандидат медицинских наук; **Д. Ю. Усупжанова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, младший научный сотрудник лаборатории №1 Центра биомедицинских технологий; **В. А. Брунчук** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, младший научный сотрудник лаборатории №1 Центра биомедицинских технологий; **А. А. Расторгуева** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, техник лаборатории №1 Центра биомедицинских технологий; **Е. Е. Ломоносова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, младший научный сотрудник лаборатории №1 Центра биомедицинских технологий; **И. В. Кобзева** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, заведующая криобанком Центра биомедицинских технологий, кандидат медицинских наук; **А. Е. Махова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, младший научный сотрудник отдела экспертизы биомедицинских технологий Центра биомедицинских технологий; **Т. В. Карасева** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, начальник отдела экспертизы биомедицинских технологий Центра биомедицинских технологий; **А. Ю. Бушманов** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, первый заместитель генерального директора, доктор медицинских наук, профессор; **А. С. Самойлов** — ФГБУ «Государственный

научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, генеральный директор, кандидат медицинских наук.

ELABORATING OF A COMPLEX CRYOCONSERVATION PROTOCOL OF BLOOD VESSELS FOR THE TISSUE-SPECIFIC MATRICES

S. E. Lauk-Dubitsky — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Specialized Laboratory of Cytology, Genetics and Immunology, Biologist; **T. A. Astrelina** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Head of the Center of Biomedical Technologies, Doctor of Medical Sciences; **V. A. Brumberg** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Specialized Laboratory of Cytology, Genetics and Immunology, Junior Researcher; **V. A. Nikitina** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Cryobank of the Center of Biomedicine Technologies, Biologist, Candidate of Medical Sciences; **Yu. B. Suchkova** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, the KDL Specialized Laboratory of Cytology, Genetics and Immunology of the Center Physician, Candidate of Medical Sciences; **D. Yu. Usupzhanova** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, the Center of Biomedical Technologies, Junior Researcher; **V. A. Brunchukov** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, the Center of Biomedical Technologies, Genome Editing Laboratory, Junior Researcher; **A. A. Rastorgueva** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, the Center of Biomedicine Technologies, Laboratory Technician; **E. E. Lomonosova** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Cryobank of the Center of Biomedicine Technologies, Biologist, Candidate of Medical Sciences, Junior Researcher; **I. W. Kobzeva** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Head of the Cryobank of the Center of Biomedicine Technologies, Candidate of Medical Sciences; **A. E. Makhova** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Center of Biomedical Technologies Expertise, Junior Researcher; **T. V. Karaseva** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, the Center of Biomedical Technologies, Head of the Department of Biomedical Technologies Expertise; **A. Yu. Bushmanov** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Head of the Center for Biomedical Technologies, First General Director Deputy, Professor, Doctor of Medical Sciences; **A. S. Samoilov** — State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, General Director, Candidate of Medical Sciences.

Дата поступления — 06.11.2017 г.

Дата принятия в печать — 21.12.2017 г.

Лаук-Дубицкий С. Е., Астрелина Т. А., Брумберг В. А., Никитина В. А., Сучкова Ю. Б., Усупжанова Д. Ю., Брунчук В. А., Расторгуева А. А., Ломоносова Е. Е., Кобзева И. В., Махова А. Е., Карасева Т. В., Бушманов А. Ю., Самойлов А. С. Разработка протокола комплексной криоконсервации кровеносных сосудов для создания тканеспецифичных матриц. Саратовский научно-медицинский журнал 2017; 13 (4): 891–900.

Цель: разработать протокол комплексной криоконсервации кровеносных сосудов в полидиметилсилоксане для создания тканеспецифичных матриц. **Материал и методы.** Материалом исследования являлись подвздошные артерии от посмертных доноров, изъятые в рамках мультиорганного донорства, отбракованные по неустойчивости и утилизированные впоследствии. В качестве хладотеплоносителя использовался полидиметилсилоксан (ПДМС) вязкостью 5–25 сантистокс (Спектропласт, Россия). Проводили стендовые испытания скорости охлаждения и нагрева кровеносного сосуда в ПДМС, тестирование нагрева и охлаждения ПДМС до рабочих температур (–80°C) разными способами и вариантов его теплоизоляции. Оценивали различные скорости охлаждения сосуда во время криоконсервации. Выполняли моделирование трех типов рабочих камер для криоконсервации, стерилизации и размораживания до десяти сосудов, моделирование схем криоконсервации и размораживания сосудов в ПДМС в разных условиях; подбор подложек из силикона и пластика для равномерной фиксации сосудов разных типоразмеров в рабочих камерах или без них. **Результаты.** Разработанный протокол дает возможность криоконсервировать от 1 до 10 и более сосудов всех основных типоразмеров как сразу после изъятия, так и после транспортировки в лабораторию; варьировать скорость охлаждения от 1,5 до 300°C/мин и выше; использовать лабораторию с разным уровнем комплектации, как с жидким азотом, сухим льдом, так и только с медицинским морозильником. **Заключение.** Разработанный протокол позволяет применять его в случаях комплексной криоконсервации кровеносных сосудов для создания тканеспецифичных матриц и может быть рекомендован для проведения доклинических испытаний.

Ключевые слова: криоконсервация, полидиметилсилоксан, тканевая инженерия.

Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, Brumberg VA, Nikitina VA, Suchkova YuB, Usupzhanova DYU, Brunchukov VA, Rastorgueva AA, Lomonosova EE, Kobzeva IW, Makhova AE, Karaseva TV, Bushmanov AYU, Samoilov AS. Elaborating of a cryoconservation protocol of blood vessels for the tissue-specific matrices. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2017; 13 (4): 891–900.

Purpose: to create a protocol for complex cryoconservation of blood vessels in polydimethylsiloxane to create tissue-specific matrices. **Material and Methods.** The material of the study was the iliac arteries from postmortem donors, seized in the multi-organ donation, rejected for unclaimed and disposed of later. Polydimethylsiloxane was used as a coolant (PDMS) with a viscosity of 5–25 centistokes (Spectroplast, Russia). Bench testing of cooling and heating of the blood vessel in PDMS, testing of heating and cooling of PDMS up to operating temperatures (–80°C) in different ways and variants of its thermal insulation, assessment of different cooling rates of the vessel during cryoconservation, modeling of 3 types of working chambers for cryoconservation, sterilization and defrosting of up to 10 vessels, modeling of cryoconservation and thawing of vessels in PDMS under different conditions, selection of substrates from silicone and plastic for uniform fixation of vessels which are of size or size in the working chambers or without them. **Results.** The developed protocol allows cryopreserved from 1 to 10 or more vessels of all basic sizes both immediately after removal and after transportation to the laboratory, to vary the cooling rate from 1.5 to 300°C/min and above, to be used with different levels of laboratory equipment, as with liquid nitrogen, dry ice, and only with a medical freezer. **Conclusion.** The developed protocol allows to apply it in cases of complex cryoconservation of blood vessels to create tissue-specific matrices and can be recommended for preclinical testing.

Key words: cryoconservation, polydimethylsiloxane, tissue engineering.

Введение. Одной из основных проблем в современной сердечно-сосудистой хирургии остается отсутствие функционально надежных сосудистых протезов среднего и малого диаметра, необходимых для протезирования малых артерий и вен при заболеваниях периферической сосудистой системы, а также для аортокоронарного шунтирования при ишемических болезнях сердца. Для увеличения количества и доступности донорской сосудистой ткани создаются банки биологического материала, однако методы криоконсервации имеют ограничение по производительности, по безопасной фиксации сосудов и их криоконсервации сразу после изъятия и по возможности их повторной криоконсервации [1–4]. Согласно результатам проведенных ранее экспериментов криоконсервация сосудов в полидиметилсилоксане низкой вязкости (ПДМС) позволяет сохранять ткань без значительных негативных изменений в ее структурной целостности, однако для дальнейшего применения подобного метода требуется создание и оптимизация протокола криоконсервации и размораживания [5–10].

Цель: изучение использования полидиметилсилоксана в качестве хладотеплоносителя и криопротектора, обладающего низкой температурой стеклования и гидрофобными свойствами; разработать протокол комплексной криоконсервации кровеносных сосудов в полидиметилсилоксане для создания тканеспецифичных матриксов.

Материал и методы. Материалом исследования являлись подвздошные артерии от посмертных доноров, изъятые в рамках мультиорганного донорства, отбракованные по невостробованности и утилизированные впоследствии. В качестве хладотеплоносителя использовался ПДМС вязкостью 5–25 сантистокс (Спектропласт, Россия).

Стендовые испытания процессов теплообмена. Для подтверждения математического моделирования использовались три участка подвздошной артерии длиной 4 см каждый и ПДМС-5 в количестве 1000 мл, из них 500 мл залито в пластиковый контейнер и охлаждено до -80°C в камере морозильника, а оставшиеся 500 мл помещены в криоконтейнер на слой сухого льда. Для сосудов подготовлена силиконовая подложка с вырезанным окном ($0,5 \times 0,5$ см) на расстоянии 3 см от одного из концов. Для проведения измерений температуры 6 раз в секунду использовалась термопара с диаметром головки, не превышающим 1,5 мм, и диапазоном измерений от -200°C до $+450^{\circ}\text{C}$. Термопара подключалась по трехпроводной схеме. Кабельные входы подсоединены клеммами к вторичным преобразователям Овен MB110, а затем на порт USB для последующей обработки данных на компьютере. Проведено три измерения с размещением термопары в просвете сосуда с прилеганием к подложке, для этого термопару изнутри пропускали через окно подложки и затем крепили сосуд поверх нее. В итоге для первого измерения сосуд с закрепленной термопарой помещался в контейнер с ПДМС (-55°C) в морозильнике с открытой дверцей и активными теплопритоками. Охлаждение проходило с постоянным перемешиванием сосуда в объеме ПДМС со скоростью 2 об/сек. Для второго измерения сосуд помещался в криоконтейнер с ПДМС (-75°C) между слоями сухого льда и охлаждался аналогично перво-

му измерению. Третье измерение проходило так же, но сосуд не перемещался по объему ПДМС во время охлаждения. Измерение нагрева замороженного сегмента проходило по окончании каждого из измерений без дополнительных процедур, путем погружения сосуда с подключенным термометром в контейнер с ПДМС комнатной температуры и интенсивного перемещения по его объему в течение трех минут, однако для третьего измерения сосуд нагревался в объеме ПДМС без перемешивания.

Во второй части эксперимента в криоконтейнер закладывали пакеты с сухим льдом по всему периметру, оставляя по центру свободное пространство, куда устанавливалась емкость с предварительно охлажденным ПДМС-5 и магнитным якорем на дне. Затем криоконтейнер помещался на магнитную мешалку со скоростью 800 об/мин. Для криоконсервации СКС на подложке с закрепленным термометром сопротивление опускался в емкость без дополнительного перемешивания. Для размораживания использовалась аналогичная схема с емкостью с ПДМС комнатной температуры.

Тестирование охлаждения и нагрева ПДМС. Проводили тестирование охлаждения ПДМС до рабочих температур разными способами (от $+22$ до -75°C) и определяли его оптимальный рабочий объем для этапа подготовки растворов. Охлаждение ПДМС проходило последовательно: для первого варианта две емкости на 250 и 500 мл с ПДМС устанавливались в камере низкотемпературного морозильника; для второго варианта те же емкости охлаждались в криоконтейнере с частичным заполнением жидким азотом и фиксацией изменения температуры в режиме реального времени с помощью термометра; для третьего варианта емкость охлаждалась в криоконтейнере с заполнением сухим льдом до трети емкости с нахождением криоконтейнера при комнатной температуре. Проводили контроль температуры каждые 10 минут. Нагрев емкости ПДМС происходил без перемешивания при комнатной температуре.

Моделирование рабочих камер и подложек для фиксации сосудов. Для подбора подложек с равномерной фиксацией сосудов разных типоразмеров рассмотрены следующие варианты: 1) стерильные одноразовые полые пластиковые подложки для сосудов с диаметром от 5–8 мм; 2) стерилизуемые силиконовые подложки для сосудов с диаметром 5 мм и менее; 3) две конусовидные подложки на концах сосуда с его растягиванием по длине для сосудов с диаметром 4 мм и менее; 4) пластиковые подложки на основе стерильных шприцов для сосудов диаметром более 1 см, в том числе для аорт.

После подбора подложек смоделированы три варианта рабочих камер для крепления и равномерной фиксации по всей длине разного количества СКС от одного или разных доноров для дальнейшей компоновки из доступных стерильных расходных материалов: 1) камера на 1 сосуд с вертикальным креплением на силиконовой подложке с использованием емкостей 50–100 мл с двумя портами на дне и в крышке; 2) камера на 3 сосуда с вертикальным креплением в емкости на 50 мл и последующей установкой в большую емкость на 500–1000 мл; 3) открытая камера для горизонтального крепления 10 и более сосудов на пластиковых подложках с использованием двух держателей со сквозными портами.

Моделирование схем криоконсервации и размораживания. Для реализации схем криоконсервации проведено моделирование трех вариантов

теплоизоляции емкости с ПДМС или создания рабочих зон с минимальными перепадами температур и теплопритоками воздуха комнатной температуры: 1) мобильный короб из теплоизоляционного материала Cryogel-Z (AspenAerogels, США) (30x50x60 см; В/Ш/Г) с открывающейся передней стенкой и без задней стенки для размещения на металлической полке в камере низкотемпературного медицинского холодильника; 2) термоконтейнер с его охлаждением по контуру сухим льдом (от 3 кг на 1 л ПДМС) или жидким азотом с контролем за температурой; 3) обертывание емкости с охлажденным ПДМС теплоизоляционным материалом, обработанным спиртом или дополнительно стерилизованным.

По результатам исследований смоделировано несколько схем криоконсервации кровеносных сосудов для их последующей апробации:

1. Стационарная криоконсервация сосудов без стерильного ламинарного потока (криобанк). Рекомендуется использование рабочей зоны с теплоизоляцией и охлаждение в низкотемпературном медицинском холодильнике с вертикальным или горизонтальным погружением сосуда на любой из подложек в емкость с ПДМС в течение 1 минуты. Альтернативным вариантом является фиксация сосуда в емкости с небольшим количеством ПДМС на сосуд. Для криоконсервации сосудов в открытой камере на 10 сосудов помещали в контейнер с ПДМС (минимум 3 л) с теплоизоляцией.

2. Стационарная криоконсервация СКС в условиях стерильного ламинарного потока с использованием рабочих камер. Использовали криоконтейнер с жидким азотом или слоем сухого льда для теплоизоляции и охлаждения емкости с ПДМС. Для рабочих камер на 1 и 3 сосуда заполняли ПДМС в криоконтейнере, устанавливали в них крышки с сосуда и перемешивали с попеременно раскручиванием и закручиванием крышки для создания интенсивного перемешивания ПДМС в емкости.

3. Криоконсервация по «мобильной схеме» для обработки сосудов сразу после их изъятия. Использовали компактный криоконтейнер со слоем сухого льда и пластиковой емкостью с ПДМС-5. Криоконсервация проходила по стандартной схеме с погружением сосуда на подложке в емкость с ПДМС. В случае отсутствия сухого льда использовали емкость с жидким азотом и обязательным дополнительным слоем теплоизоляции во избежание размораживания объема ПДМС.

Хранение криоконсервированных СКС осуществляли без ПДМС, так как ПДМС-5 может застывать

в течение суток. При всех схемах рекомендуется использовать стерильные пакеты для упаковки криоконсервированных СКС, зафиксированных в камере или без них.

Использовали следующие схемы размораживания криосохраненных кровеносных сосудов: во-первых, размораживание в емкости с ПДМС комнатной температуры, подходящее для криоконсервации по мобильной схеме; во-вторых, стационарное размораживание в условиях ламинарного потока в водяной бане и с перемешиванием с использованием магнитного якоря на дне емкости с ПДМС. Для размораживания сосудов без стерилизации использовали фильтрованный объем ПДМС-5. Стерильный ПДМС-25 использовали для нагревания сосудов после их стерилизации.

Результаты стендовых испытаний процессов теплообмена. По результатам стендовых испытаний скорость охлаждения при размещении контейнера с ПДМС в камере морозильника составила 138°C/мин, а при использовании криоконтейнера с сухим льдом 155°C/мин, в обоих случаях криоконсервация проходила с перемещением СКС в объеме ПДМС со скоростью 150–200 об/мин или 800 об/мин без перемещения СКС, но с перемешиванием ПДМС в емкости при использовании магнитной мешалки. Скорость преодоления критической температуры для клеток с +20°C до температуры, близкой к -40°C, составила 15 сек (240°C/мин) (таблица). Скорость нагрева в обоих случаях была идентична скорости охлаждения; при охлаждении и нагреве без перемешивания скорость значительно падала и составляла 32–37°C/мин (общее время охлаждения 150 сек) (рис. 1). Изначальная температура раствора может снизить минимальную скорость охлаждения с 32 до 1,5°C/мин, как было показано в отдельном эксперименте ранее.

Результаты тестирования охлаждения и нагрева ПДМС. Натурный эксперимент по охлаждению объема ПДМС в емкости на 500 мл показал, что охлаждение ПДМС в морозильнике от +20 до -60°C занимает более 90 минут для объема 250 мл и 120 минут для объема 500 мл; охлаждение ПДМС в жидком азоте занимает менее 10 минут, но обязательно требует проверки материала емкости на устойчивость к сверхнизким температурам; охлаждение ПДМС в контейнере с сухим льдом может занимать 60 минут с погружением емкости в сухой лед на 30% от высоты и 50 минут с заполнением по горлышку и изначальной температурой раствора в +27°C. Если используется один и тот же объем ПДМС для криоконсервации и размораживания, то его нагрев удоб-

Возможные варианты скоростей охлаждения сосудов в ПДМС

Изначальная температура ПДМС (°C)	Условия охлаждения	Скорость перемешивания (оборотов/мин)	Скорость охлаждения (°C/мин)
+20	Морозильник	б / перемешивания	1,5°C/мин
0	Морозильник	б / перемешивания	5–10°C/мин
-70	Теплоизоляция, криоконтейнер	б / перемешивания	35°C/мин
-70	Теплоизоляция, криоконтейнер	50 об/сек вручную или 350 об/сек магнитного якоря	90°C/мин
-70	Теплоизоляция, криоконтейнер	100 об/сек вручную или 350 об/сек магнитного якоря	150°C/мин
-70	Теплоизоляция, криоконтейнер	200 об/сек вручную или 800 об/сек магнитного якоря	300°C/мин
-70 (-120)	Жидкий азот по контуру	200 об/сек вручную или 800 об/сек магнитного якоря	400°C/мин и выше

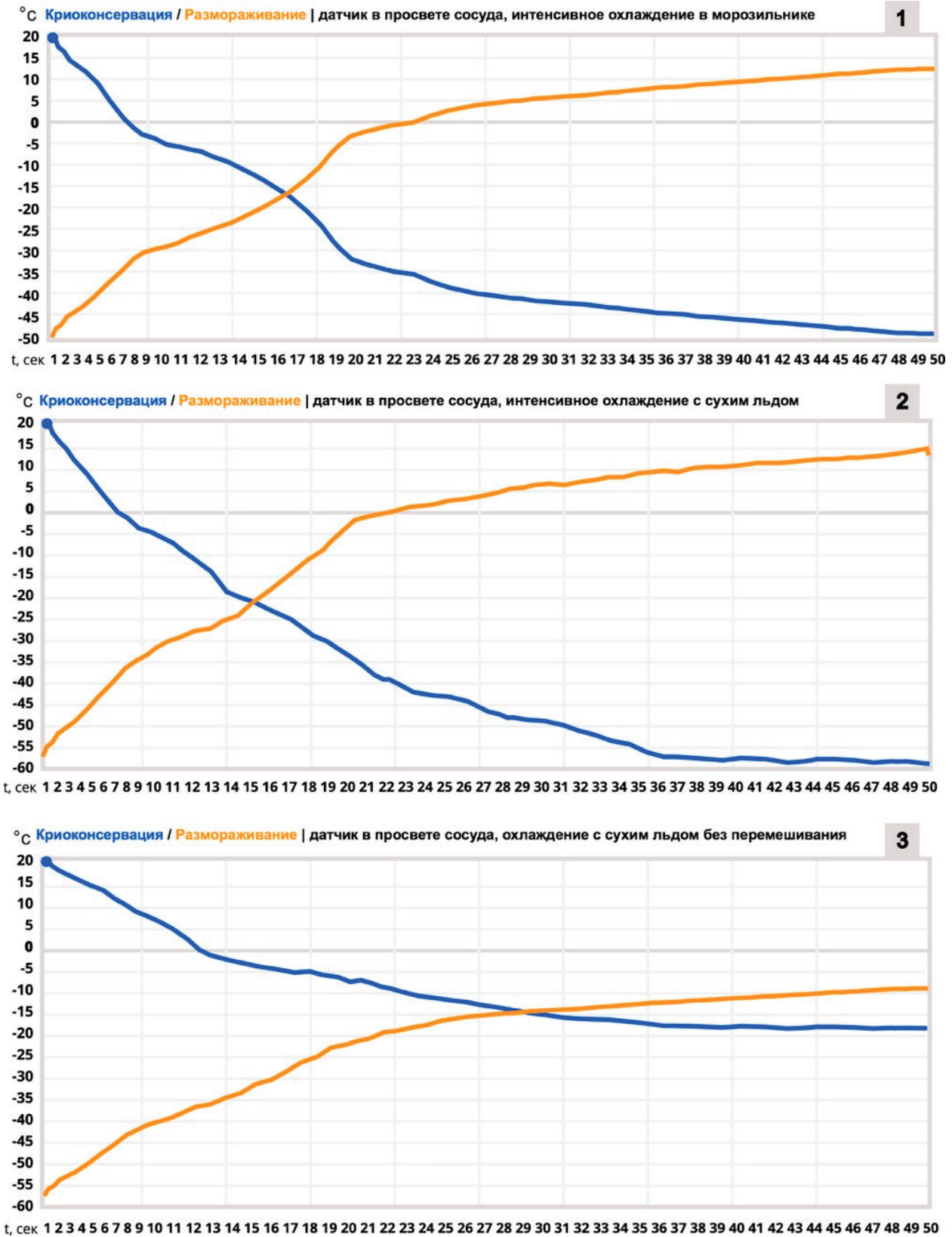


Рис. 1. Стендовые испытания скорости охлаждения и нагрева: 1 — охлаждение с размещением контейнера с ПДМС в морозильнике; 2 — охлаждение с размещением контейнера с ПДМС в криоконтейнере меж слоев сухого льда; 3 — охлаждение с размещением контейнера с ПДМС в криоконтейнере меж слоев сухого льда, но без перемешивания. Во всех трех схемах нагрев происходил при комнатной температуре в контейнере с ПДМС, в случае третьей схемы без перемешивания

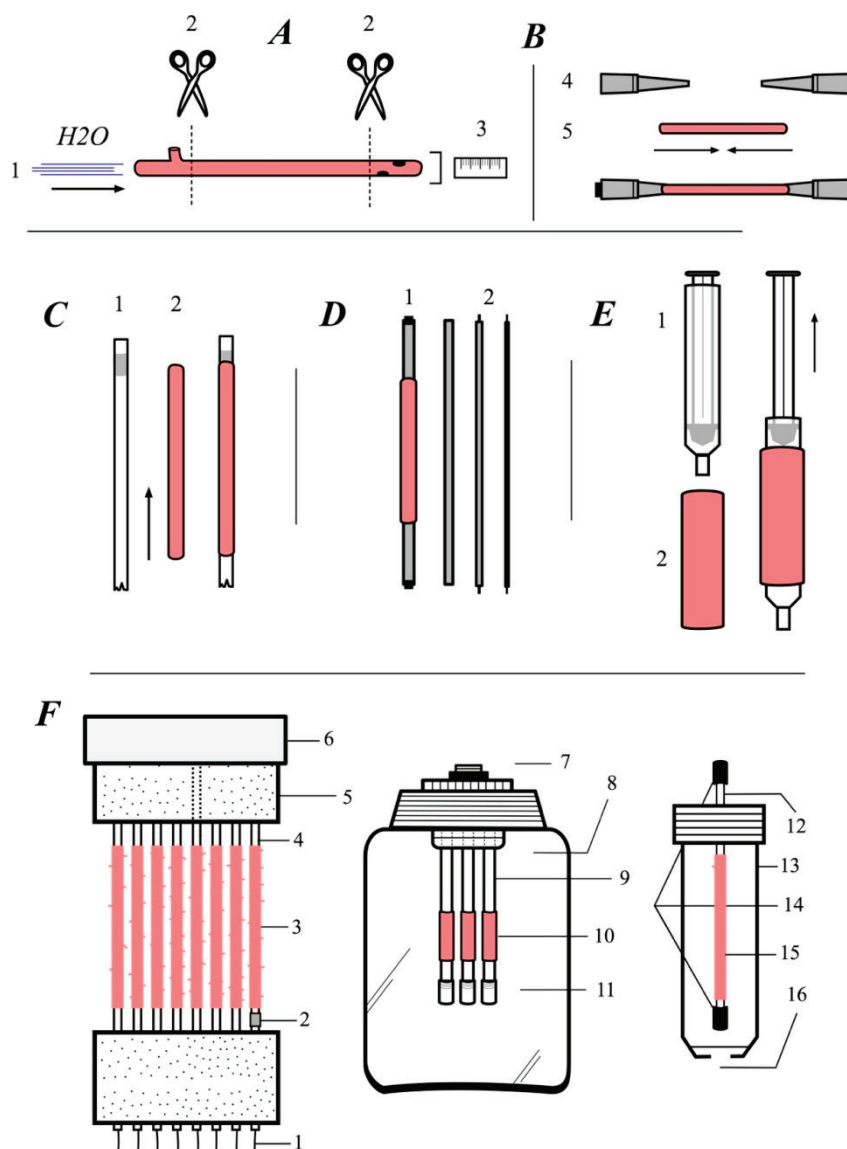


Рис. 2. Результаты моделирования рабочих камер и подложек для фиксации:

A. Подготовка сосуда к фиксации на подложке: промывание (1), измерение (3), отсечение бифуркаций и пораженных участков (2). **B.** Фиксация сосуда (5) на двух наконечниках (4). **C.** Фиксация сосуда (2) на пластиковой подложке (1). **D.** Силиконовые подложки (1), в т.ч. с дополнительным проволочным каркасом (2). **E.** Фиксация крупного сосуда (2) на подложке в виде стерильного шприца (1). **F.** Камеры для фиксации сосудов. Камера на 10 сосудов: 1 — проволочные направляющие для вставки в порты; 2 — ярлык с информацией о сосуде; 3 — сосуд; 4 — пластиковая подложка; 5 — держатель (пенопласт); 6 — крышка. Камера на 3 сосуда: 7 — порт вакуумизации; 8 — крышка и промежуточная емкость; 9 — подложки (силикон); 10 — сосуд; 11 — заслонки для блокировки сосудов. Камера на 1 сосуд: 12 — подложка (силикон); 13 — пробирка (50 мл); 14 — заслонки для блокировки; 15 — сосуд; 16 — порт вакуумизации

нее осуществлять в водяной бане с применением магнитной мешалки, в ином случае без перемешивания ПДМС нагревается до $+20^{\circ}\text{C}$ при комнатной температуре за 150 минут.

Результаты моделирования рабочих камер и подложек для фиксации. Выбранные для протокола криоконсервации подложки обеспечивают широкие возможности по подбору для каждого отдельного типоразмера сосудистого биопротеза, более того, существует техническая возможность подобрать подложку из того или иного материала под любой существующий диаметр сосуда, как человека, так и лабораторных животных. Однако использование подложек с их фиксацией в камерах для криоконсервации накладывает ряд ограничений по их размеру, существуют сложности с обработкой сосуда длиной более 20 см и диаметром меньше 1 мм. Однако альтернативные и доступные варианты равномерной

фиксации сосудов при криоконсервации труднодоступны.

Во время самостоятельного создания опытных образцов камер рекомендуется использовать специально подготовленные стерильные пробирки (50 мл, 30x115 мм, Corning, США) для индивидуальных камер; 500 мл емкости от системы для вакуумной стерилизующей фильтрации растворов (93x93x121 мм; Rapid-FilterMax, TPP, Швейцария) и стерильные пластиковые емкости на 50 мл с крышкой (38x63 мм) для камеры для вертикального крепления трех сосудов; два пенопластовых держателя для пробирок (100x100 мм) и двух пластиковых крышек для создания открытой камеры для горизонтального крепления 10 и более сосудов. После создания портов и герметизации все камеры необходимо стерилизовать.

При реализации трех вариантов рабочих камер из стерильных расходных материалов (рис. 2) обе-

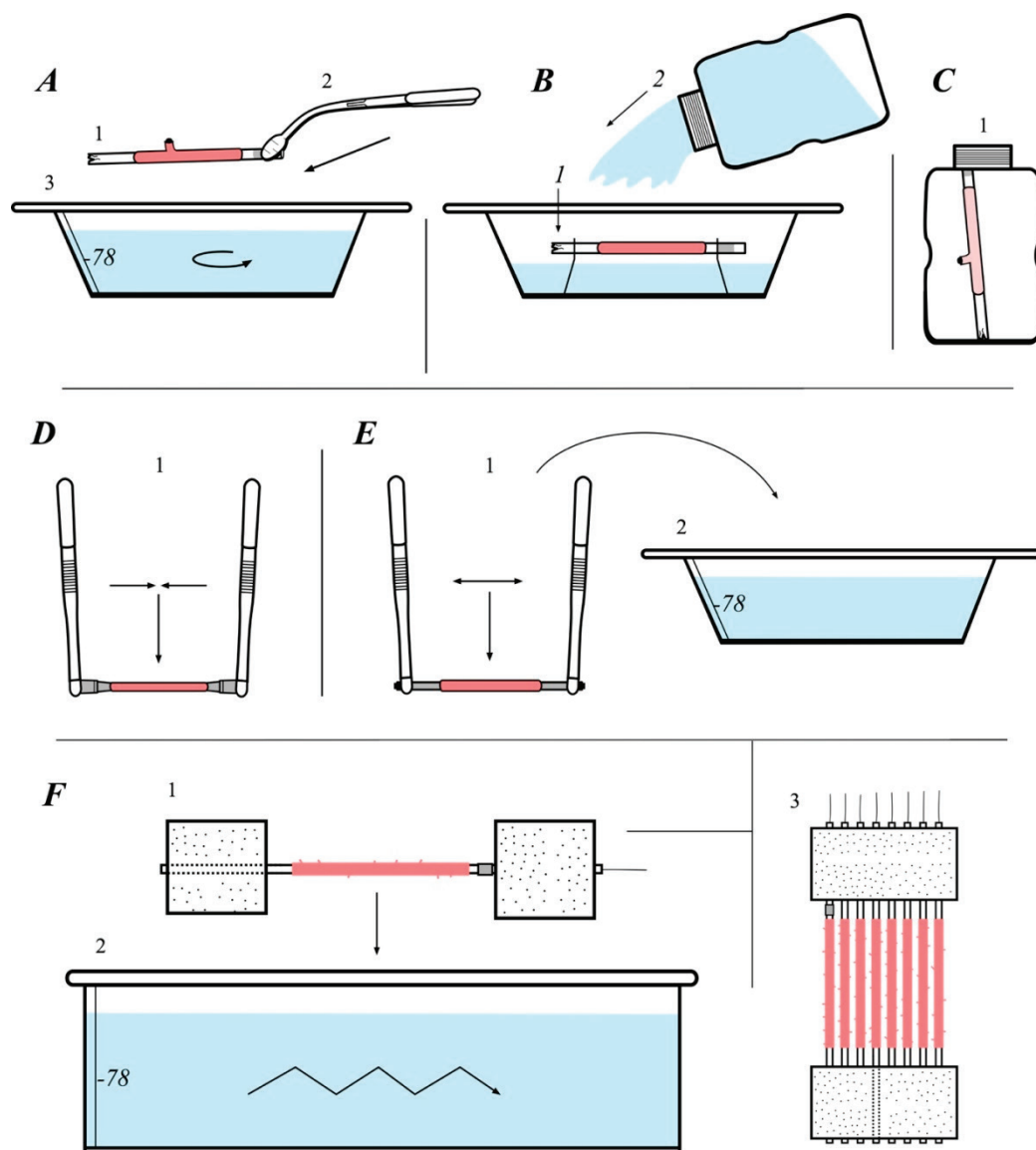


Рис. 3. Результаты моделирования стационарной криоконсервации сосудов в т.н. «грязных» помещениях:
A. Погружение сосуда на пластиковой подложке (1) в емкость с ПДМС (3) под контролем пинцета (2). **B.** Криоконсервация сосуда на подложке (1), зафиксированного на дне емкости с ПДМС, путем заливания дополнительного объема ПДМС сверху (2). **C.** Хранение сосуда на подложке в пустой емкости (1) без контакта со стенками. **D-E.** Погружение сосуда на двух наконечниках (D-1) или на силиконовой подложке (E-1) в емкость с ПДМС (2). **F.** Погружение открытой камеры на 10 сосудов (1) в емкость с ПДМС (2); вид на камеру сверху (3)

спечивается достаточное удобство, скорость и безопасность криоконсервации и размораживания с возможностью обработки до 10 сосудов одновременно, в том числе с использованием магнитной мешалки с якорем на дне для интенсификации процессов теплообмена. Безопасность обработки достигается за счет равномерного крепления сосудов на подложках без создания дополнительных нагрузок на коллагеновые волокна. После охлаждения в камерах по стационарной или «мобильной» схеме, не вынимая сосудов, их можно стерилизовать с вакуумизацией, размораживать, децеллюляризировать и хранить в морозильнике.

Результаты моделирования схем криоконсервации и размораживания. Рабочая зона с теплоизоляцией необходима согласно натурному эксперименту, общий нагрев камеры низкотемпературного морозильника неизбежно происходит при криоконсервации более одного сосуда и приводит к тому, что замороженный сосуд хранится в неоптимальных

температурных условиях: так, температура камеры может подниматься до -40°C и опускаться до необходимых -80°C в течение более чем 5 часов, например морозильников Snijders и Sanyo. Что же касается влияния непосредственно на процесс криоконсервации, то ПДМС в изолированном контейнере или с фиксацией в камере не успевает нагреться более чем на 5°C при криоконсервации 1 сосуда, что делает использование изоляционного короба излишним, однако при комплексной обработке должен соблюдаться жесткий контроль за температурой. После проведенной криоконсервации в коробе можно хранить сосуды без риска теплопритоков при открытии камеры, а также использовать его для транспортировки с помещением в контейнер, в этом случае при должной герметизации температура будет держаться на одном уровне в течение нескольких часов. При использовании второй рабочей зоны с контурным охлаждением жидким азотом в условиях ламинарного потока необходимо следить, чтобы температу-

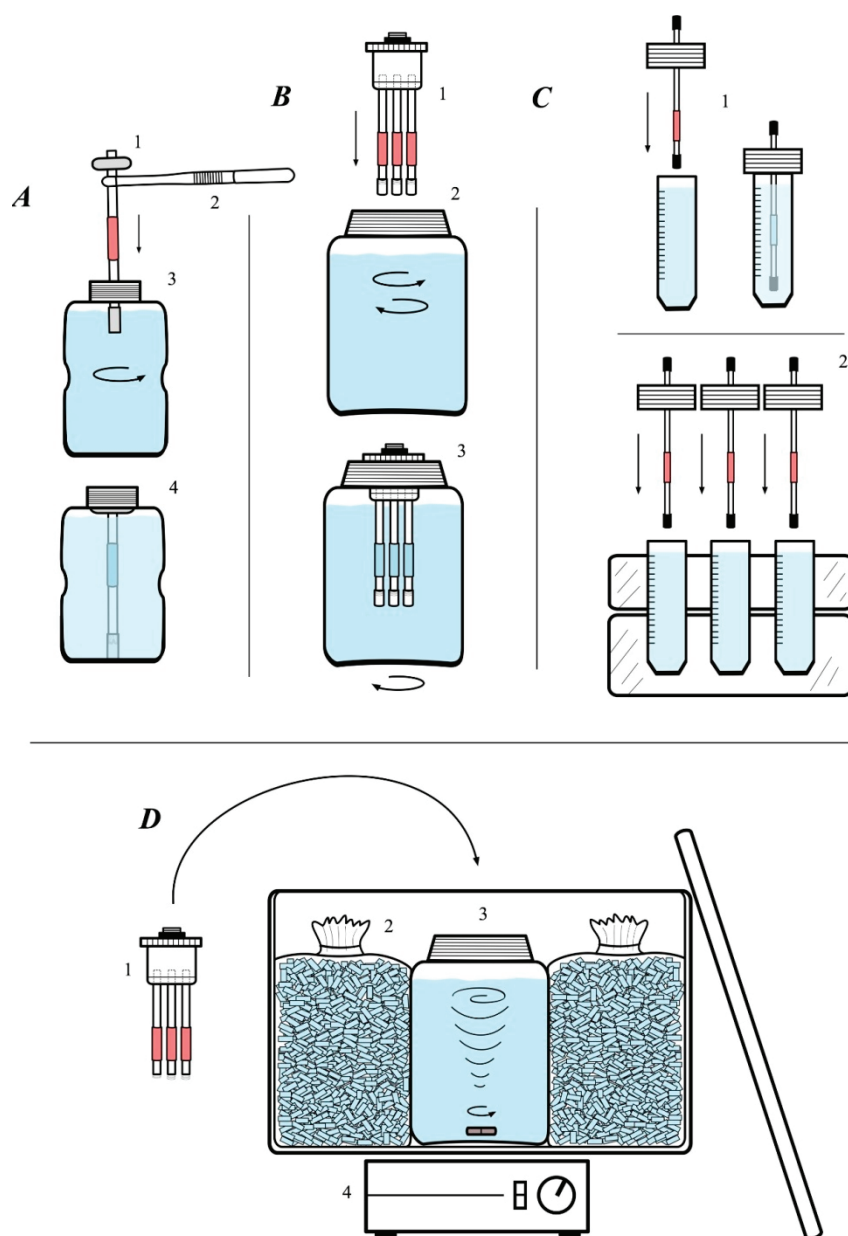


Рис. 4. Результаты моделирования стационарной криоконсервации сосудов в т.н. «чистых» помещениях:
А. Погружение сосуда на пластиковой подложке со стопором (1) в емкость с ПДМС (3) под контролем пинцета (2) с дальнейшим перемешиванием. **В.** Криоконсервация в камере на 3 сосуда: крышка с сосудами на подложке (1) устанавливается в емкость с ПДМС и перемешивается путем закручивания и раскручивания; во втором варианте вся емкость встряхивается (3) вручную. **С.** Погружение сосудов на силиконовых подложках, закрепленных на крышках в емкости с ПДМС (50 мл); в случае одной емкости (1) и трех с теплоизоляцией (2). **Д.** Криоконсервация в камере на 3 сосуда (1) с теплоизоляцией, сухим льдом в пакетах (2), емкостью с магнитным якорем на дне (3) и магнитной мешалкой (4)

ра ПДМС не падала ниже -100°C и не поднималась выше -70°C , а также использовать заведомо больший объем ПДМС. Помимо этого, учитывая высокую термическую стабильность ПДМС, вариант ограниченной теплоизоляции лишь одной емкости с ПДМС для размещения в ламинарном шкафу может быть наиболее удобным для реализации на практике.

Обсуждение. Натурный эксперимент по тестированию скорости охлаждения и нагрева кровеносных сосудов в ПДМС показал возможность достижения больших скоростей снижения температуры, в особенности с учетом того, что во время стендовых испытаний термопара показывала изменение температуры не между слоями сосуда, а в его просвете с прямым контактом с подложкой и внутренней стенкой сосуда с наличием воздушного слоя по бокам термопары;

таким образом, фактическое время охлаждения биоткани было меньше. При этом проведение теплоизоляции контейнера позволяет оператору гибко регулировать скорость снижения или подъема температуры в зависимости от протокола криоконсервации, что было показано на стендовых испытаниях, интенсификация же теплообмена достигается за счет машинного или ручного динамического распределения ПДМС по контейнеру. Более того, в случае использования кровеносных сосудов меньшего диаметра, за счет меньшей толщины их стенок и общего объема биоткани, скорость их криоконсервации и размораживания будет достоверно выше.

Эффективное использование ПДМС с учетом описанных данных, а также высокая скорость криоконсервации могут быть труднодостижимы без при-

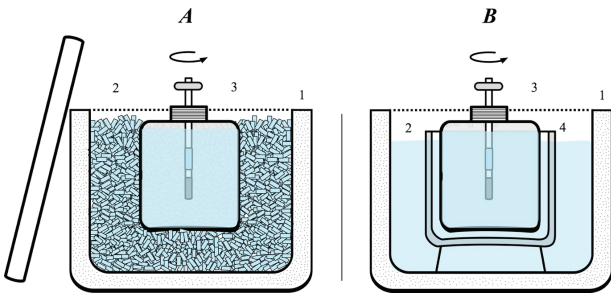


Рис. 5. Криоконсервация сосудов в т.н. «грязных» помещениях по мобильной схеме:
А. Криоконтейнер (1), слой сухого льда (2), емкость с ПДМС (3) и сосуд на подложке внутри нее с вращением по малому радиусу. **В.** Криоконтейнер (1), жидкий азот (2), теплоизоляция (4), емкость с ПДМС (3) и сосуд на подложке внутри нее.

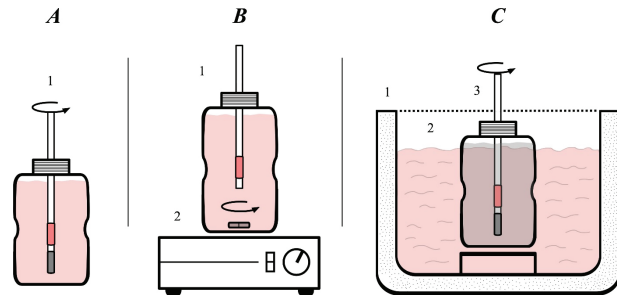


Рис. 6. Варианты размораживания сосудов:
А. Ручное размораживание сосуда на пластиковой подложке в емкости с ПДМС комнатной температуры. **В.** Автоматическое размораживание сосуда на пластиковой подложке в емкости с ПДМС, установленной на магнитной мешалке. **С.** Ручное размораживание сосуда на пластиковой подложке в емкости с ПДМС и с дополнительным контурным нагревом горячей водой в контейнере или на водяной бане

менения собранных камер и подложек. Так, созданные для упрощения процедуры криоконсервации камеры для фиксации временных сосудов позволяют оптимизировать временные затраты и являются более удобными в сравнении с пакетами для консервации (которые часто доступны только для замораживания крови) и банками из-под сред. Такие камеры в трех вариациях дают возможность донорские сосуды в виде артерий и вен с широким диапазоном внутренних диаметров-типоразмеров, в частности, за счёт использования схем фиксации оригинальной конструкции. Все камеры доступны для дополнительной стерилизации и могут использоваться для последующего хранения криоконсервированных кровеносных сосудов при температуре -80°C с дополнительной упаковкой в самозапаивающиеся пакеты с маркировкой.

Стационарная криоконсервация СКС со стерильным ламинарным потоком позволяет обрабатывать сегменты кровеносных сосудов в условиях наибольшей безопасности, она может быть применена в случае криоконсервации СКС после стерилизации (в т.ч. радиационной), а также если будет проводиться их химическая стерилизация до или после криоконсервации без транспортировки в другие помещения. Основным же приложением данной схемы является проведение последующей обработки размороженных кровеносных сосудов по протоколам тканевой инженерии в том же помещении, в частности для их использования в качестве тканеспецифичных матриц. Стационарная криоконсервация СКС без стерильного ламинарного потока без использования камер может быть использована для случаев, когда криосохраненные кровеносные сосуды будут подвергаться радиационной стерилизации при сверхнизких температурах, в этом случае проведение криоконсервации в условиях ламинарного потока является избыточным, она также применима в случаях использования криосохраненной сосудистой ткани исключительно в научных целях без проведения трансплантации в том или ином виде. Подобная схема может быть реализована в полной мере и в стерильных помещениях при наличии там низкотемпературного морозильника. В этом случае для дополнительной безопасности полки морозильника следует проложить стерильными салфетками во избежание попадания на них ПДМС. Криоконсервация по так называемой «мобильной схеме» для обработки сосудов сразу после их изъятия с проведением всех операций непосредственно в секционном зале

патанатомического отделения или в полевых условиях полностью аналогична стационарной схеме в нестерильных помещениях относительно применимости, с той лишь разницей, что ее использование положительно сказывается на конечном состоянии СКС за счет экономии времени и минимизации рисков развития тепловой ишемии. Она также удобна в случае необходимости транспортировки СКС после криоконсервации на значительные расстояния для их радиационной стерилизации.

В итоге смоделированные схемы криоконсервации сосудов, а именно стационарная схема без стерильного ламинарного потока (рис. 3), стационарная схема со стерильным ламинарным потоком (рис. 4), мобильная схема (рис. 5), а также схемы размораживания (рис. 6) учитывают большинство особенностей проведения криоконсервации в ПДМС и опыт предыдущих экспериментальных работ, а также позволяют создать на их основе протокол криоконсервации от 1 до 10 и более сосудов всех основных типоразмеров как сразу после изъятия, так и после транспортировки в лабораторию, с варьированием скорости охлаждения от $1,5$ до $300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, использованием жидкого азота, сухого льда и конвенционного охлаждения в морозильниках.

Заключение. Таким образом, разработан протокол комплексной криоконсервации кровеносных сосудов для создания тканеспецифичных матриц, что при криоконсервации и размораживании сосудистой ткани в полидиметилсилоксане не приводит к ее растрескиванию, расслаиванию и обширному цитолизу. Полученные результаты необходимо учитывать при дальнейшем проведении доклинических испытаний на лабораторных животных.

Конфликт интересов отсутствует.

Авторский вклад: концепция и дизайн исследования, написание статьи — С. Е. Лаук-Дубицкий; получение данных — С. Е. Лаук-Дубицкий, Т.А. Астрелина, В.А. Брумберг; обработка данных — Ю.Б. Сучкова, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, Е.Е. Ломоносова, А.Е. Махова; анализ и интерпретация результатов — С. Е. Лаук-Дубицкий, В.А. Брумберг; утверждение рукописи для публикации — Т.А. Астрелина, Ю.Б. Сучкова, В.А. Никитина, Т.В. Карасева, И.В. Кобзева, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов.

References (Литература)

1. Manuchehrabadi N, Gao Z, Zhang J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic

- nanoparticles. *Science Translational Medicine* 2017; 9 (379): eaah4586.
2. Zhao XT, Su YL, Li YF, et al. Engineering amphiphilic membrane surfaces based on PEO and PDMS segments for improved antifouling performances. *Journal of Membrane Science* 2014; 450: 111–123.
 3. Lim HM. Use of decellularized cryopreserved allografts during single ventricle reconstruction results in lower HLA sensitization than standard allograft. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2017; 36 (4): 77–78.
 4. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research* 2017; 6 (1): 12–18.
 5. Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, Saprykin VP. A novel comprehensive approach for human vascular allografts cryopreservation and radiation sterilization for the tissue engineering industry. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2015; 11 (4): 624–632. Russian (Лаук-Дубицкий С. Е., Астрелина Т. А. и др. Новый метод комплексной криоконсервации и гама-стерилизации сосудистых аллографтов человека для нужд тканевой инженерии. Саратовский научно-медицинский журнал 2015; 11 (4): 624–632).
 6. Brumberg VA, Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA. Analysis of production of the decellularized scaffolds and their potential use in cardiovascular surgery (review). *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2015; 11 (4): 617–618. Russian (Брумберг В. А., Лаук-Дубицкий С. Е., Астрелина Т. А. и др. Анализ получения децеллюляризованных матриц и их применения в сердечно-сосудистой хирургии (обзор). Саратовский научно-медицинский журнал 2015; 11 (4): 617–618).
 7. Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, Brumberg VA. Application evaluation of a polydimethylsiloxane low-viscosity for cryopreservation and radiation sterilization of human cadaveric vascular allografts. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2016; 12 (4): 662–670. Russian (Лаук-Дубицкий С. Е., Астрелина Т. А. и др. Оценка применения полидиметилсилоксана низкой вязкости для криоконсервации и радиационной стерилизации сосудистых аллографтов человека. Саратовский научно-медицинский журнал 2016; 12 (4): 662–670).
 8. Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, Fediunin AA. Scheme of the emergency mobile cryopreservation of vascular allotransplants. *Medicine of Extreme Situations* 2017; 2 (60): 181–187. Russian (Лаук-Дубицкий С. Е., Астрелина Т. А. и др. Экстренная мобильная криоконсервация сосудистых аллотрансплантатов. Медицина экстремальных ситуаций 2017; 2 (60): 181–186).
 9. Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, et al. Novel method of preliminary cryopreservation of human cadaveric vascular allografts for safety radiation sterilization. In: *Book of abstracts of Fifth international conference in radiation and application in various fields of research*. Montenegro, 2017; p. 326.
 10. Lauk-Dubitsky SE, Astrelina TA, et al. Polydimethylsiloxane-based coolant for cryopreservation and radiation sterilization of human cadaveric vascular allografts for further transplantation. *Health Physics Radiation Safety Journal* 2017; 113 (1): 24–25.