

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**



ГІПОТЕРМІЧНЕ ЗБЕРІГАННЯ ОРГАНІВ

Методичні рекомендації для самостійної роботи
аспірантів 1 курсу
галузь знань 22 Медицина
спеціальність 222 Медицина
Дисципліна «Технології кріоконсервування і тривалого зберігання
біологічних об'єктів для клінічного застосування»

Харків 2022

Рецензенти: С.О. Бичков – доктор медичних наук, професор; в.о. завідувача кафедри хірургічних хвороб медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

В.Г. Бабійчук – доктор медичних наук, с.н.с.; завідувач відділу кріофізіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 9 від 29 вересня 2022 р.)

Гіпотермічне зберігання органів: Методичні рекомендації для самостійної роботи аспірантів 1 курсу (галузь знань 22 Медицина, спеціальність 222 Медицина) з дисципліни «Технології кріоконсервування і тривалого зберігання біологічних об'єктів для клінічного застосування» / *Петренко О.Ю., Жегунов Г.Ф., Прокопюк О.С., Чиж М.О., Пахомов О.В., Глоба В.Ю., Божкова Ю.О.* / [Електронний ресурс] – Х.: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2022. – 24 с.

У методичних рекомендаціях розглядаються питання впливу гіпотермії на клітини, тканини та органи, наведені основні принципи гіпотермічного зберігання органів, середовища та апаратура для гіпотермічного зберігання, а також поширені протоколи гіпотермічного зберігання органів і тканин, призначених для трансплантації.

Для здобувачів вищої освіти на третьому освітньо-науковому рівні (доктор філософії).

ЗМІСТ

<i>Актуальність гіпотермічного зберігання</i>	2
<i>Види низькотемпературних ефектів та їх наслідки</i>	2
<i>Основні характеристики гіпотермії</i>	3
<i>Фізико-хімічні причини ушкоджень біооб'єктів при гіпотермії</i>	4
<i>Порушення біологічних властивостей</i>	5
<i>Глибина пошкоджень біооб'єктів при гіпотермії</i>	5
<i>Дія гіпотермії на клітини, тканини та органи</i>	6
<i>Основні причини ушкоджень</i>	6
<i>Дія гіпотермії на ферменти та метаболізм</i>	8
<i>Середовище та апаратура для гіпотермічного зберігання</i>	9
<i>Низькотемпературне зберігання органів та тканин</i>	13
<i>Гіпотермічне зберігання печінки, нирок та серця</i>	14
<i>Гіпотермічне зберігання рогівки</i>	15
<i>Гіпотермічне зберігання шкіри та кінцівок</i>	16
<i>Контрольні питання</i>	18
<i>Література</i>	20

1. Актуальність гіпотермічного зберігання

У багатьох випадках, коли вже неможливо відновити функції терапевтичним шляхом, для лікування хворих людей потрібна пересадка органів, тканин або частин тіла – трансплантація. Трансплантація – це заміщення пошкоджених чи відсутніх тканин та органів власними тканинами чи тканинами та органами, взятими з іншого організму. Організм, від якого беруть матеріал для трансплантації, називають донором, організм, якому пересаджують матеріал, називають реципієнтом. Відомо кілька типів трансплантації.

Зазвичай донорський матеріал беруть від людей, які загинули під час катастроф. Якщо донорський матеріал призначений для відстроченої у часі процедури або планового поповнення запасу банку органів, його слід зберігати якийсь час. Термін зберігання залежить від способу його консервації та характеру донорського матеріалу. Наприклад, тканини ендокринних органів добре переносять режими заморожування та низькотемпературної кріоконсервації, а органи можуть зберігатися лише за умов гіпотермії. Зокрема, такі органи як серце, легені, нирки, печінка, селезінка чутливі до дії заморожування, тому потребують лише гіпотермічного зберігання. При безперфузійній консервації при температурі 2-4°C термін зберігання становить: нирки – до 48 годин, печінковий трансплантат – до 15 годин, підшлункова залоза – до 15 годин, серце – до 4 годин.

2. Види низькотемпературних ефектів та їх наслідки

Дія низьких температур на біологічні об'єкти можна розділити на два принципово різних механізми в залежності від температури та агрегатного стану води. Наявність двох принципово різних аспектів дії низьких температур обумовлює зовсім різні ефекти дії на біологічні об'єкти, а також різні підходи їх використання для забезпечення безпеки.

- **Заморожування.** Охолодження біооб'єктів супроводжується кристалізацією води та утворенням льоду. При заморожуванні біооб'єкти перебувають у твердому стані, де відсутнє як зовнішнє, так і внутрішнє рідке середовище. Обмінні процеси повністю зупиняються, але не через закони Арреніуса і Ван-Гоффа, а через перетворення рідкої води на лід, зупинки руху та взаємодії молекул. Однак при цьому відносно цілими зберігаються

макромолекули, мікро- та макроструктури клітин, що зумовлює можливість відновлення життєздатності після розморожування. У замороженому стані (наприклад, при мінус 196°C) біооб'єкти можуть бути необмежено тривалий час.

Заморожування-обігрів успішно застосовується для кріоконсервації клітин, клітинних суспензій, культур клітин і тканин, сперматозоїдів, мікроорганізмів та інших дрібних об'єктів, проте не використовується для зберігання органів, тканин і частин тіла, оскільки вони дуже сильно ушкоджуються кристалами льоду.

- **Гіпотермія.** Охолодження біологічних об'єктів нижче їх фізіологічних температур, що не супроводжується кристалізацією внутрішньої та зовнішньої води. При цьому швидкість біохімічних реакцій зменшуються за законами Арреніуса і Ван-Гоффа, але обмінні процеси все-таки зберігаються на рівні гіпобіозу, що може забезпечувати довгострокове зберігання ізольованих біооб'єктів. Саме гіпотермія використовується для зберігання таких великих біооб'єктів, як органи та тканини.

3. Основні характеристики гіпотермії

При гіпотермії біологічні зразки зберігаються в рідкому середовищі та зберігають свій рідкий агрегатний стан і життєздатність. Але завдяки суттєвому зниженню швидкості обмінних процесів забезпечується збереження структури та функції ізольованих біологічних об'єктів протягом певного, але обмеженого часу. Низькі температури здатні забезпечити перехід біологічних об'єктів у стан гіпобіозу, головним чином завдяки зменшенню рухливості (кінетичної енергії) молекул біосистеми. Гіпобіоз сприяє збереженню ізольованих біооб'єктів шляхом зниження рівня метаболізму, а також потреби у кисні та харчуванні.

Недоліком гіпотермії є короткостроковість збереження біологічних об'єктів. Перевагою – відсутність дії факторів заморожування-обігріву: кристалізації, зневоднення, дії солей та ін. Тому немає необхідності застосування спеціальних захисних речовин – кріопротекторів.

В умовах гіпотермії єдиним фізичним фактором, що діє на біооб'єкти, є знижена температура, що викликає низку порушень. За законами Ван-Гоффа та Арреніуса в умовах гіпотермії швидкість біохімічних та біофізичних процесів може зменшитися у кілька разів. Збільшується в'язкість рідкого внутрішнього середовища, знижується інтенсивність Броунівського руху, обмежується ймовірність взаємодій молекул. Білки можуть частково

втрачати свою конформацію. Тому багато ферментів здатні повністю втрачати свою активність при температурах нижче 15-10°C. Причому сотні різних ферментів неоднаково реагують на зниження температури, що дискоординує та роз'єднує процеси метаболізму. Якщо ж порушується функція ключового ферменту, то зупиняється весь метаболічний шлях.

Ще більше значення при гіпотермічному зберіганні має факт ізоляції біооб'єктів з природного середовища. Після ізоляції органів чи тканин переривається їхнє кровопостачання, розвивається ішемія, дефіцит енергії та речовин.

Однак гіпотермічне зберігання, яке здійснюється при температурах 0÷4°C, дає можливість збільшити термін зберігання ізольованого з організму біооб'єкта до декількох діб. Цей термін значно менший за час функціонування клітин у фізіологічних умовах, але набагато більше часу зберігання ізольованого з організму біооб'єкта в умовах помірного (20°C) тепла. В останньому випадку клітини гинуть протягом кількох годин.

Здатність біооб'єктів зберігатись в ізольованому вигляді при гіпотермії та зберігати життєздатність, обумовлена збереженням мінімально достатнього рівня обмінних процесів на фоні суттєвого гальмування швидкості ентропійних процесів спонтанного руйнування.

3.1 Фізико-хімічні причини ушкоджень біооб'єктів при гіпотермії:

- Зменшення кінетичної енергії молекул біосистем призводить до зниження швидкості дифузії, зменшення ймовірності взаємодії молекул, порушення роботи ферментів. Змінюються гідрофобні та гідрофільні сили, порушується робота мембран, змінюється осмос. Порушуються харчування, надходження кисню, метаболізм, утворення енергії та синтез нових речовин.
- Збільшення в'язкості колоїдного вмісту клітин, що ще більше перешкоджає руху та взаємодії молекул.
- Ослаблення гідрофобних сил та взаємодій призводить до порушення багатьох функцій біологічних мембран. Порушення перенесення кисню, поживних речовин, метаболітів, води та іонів.
- За законом Ван-Гоффа швидкість некаталітичних хімічних взаємодій малих молекул зменшується в 2-4 рази при зниженні температури кожні 10°C від фізіологічних.

- За законом Арреніуса знижується швидкість біохімічних каталітичних процесів за рахунок зниження енергії активації молекул.

3.2 Порушення біологічних властивостей

Сукупність вищезазначених факторів та ізоляція призводять до *пошкодження біологічних властивостей* біооб'єктів при гіпотермії, а також обмеження часу зберігання:

- Порушуються процеси надходження поживних речовин та кисню, розвивається ішемія, що може суттєво порушити метаболізм та гомеостаз.
- Порушується процес видалення з клітин вуглекислого газу, аміаку та інших шкідливих продуктів метаболізму.
- Порушуються процеси перенесення води та іонів, що призводить до зсуву осмотичної рівноваги та набухання.
- Порушується структура та робота біологічних мембран, багатьох ферментів, особливо мембранобудованих. Це зумовлює зміни у роботі метаболічних систем клітин.
- Відбувається дискоординація метаболічних процесів через різну чутливість тих чи інших ферментів до зміни температури.
- Порушуються процеси трансформації енергії та синтетичні реакції.
- Порушуються функції клітин та нормальна клітинна кооперація у складних органах та тканинах.
- Порушуються функції органів, тканин та частин тіла.

3.3 Глибина пошкоджень біооб'єктів при гіпотермії залежить:

- *Від температури зберігання.* З одного боку, чим нижча температура, тим довше зберігається об'єкт. З іншого боку, чим нижче температури, тим сильніше модифікуються властивості колоїдних розчинів, мембран і ферментів.
- *Від часу зберігання.* Чим довше зберігається біоматеріал в умовах гіпотермії, тим значнішими можуть бути пошкодження.

- *Від середовища зберігання.* Середовище зберігання повинно бути стерильним, осмотично нейтральним до біооб'єкта, містити поживні речовини та аеруватися.
- *Від природи та розмірів самого біологічного об'єкта.* Суспензії клітин довше зберігаються, ніж тканини та органи.

4. Дія гіпотермії на тканини та органи

В даний час у клінічній практиці успішно здійснюється трансплантація нирок, серця, печінки, легень, тонкої кишки та підшлункової залози. Кількість пацієнтів, які потребують трансплантації, неухильно збільшується. Джерелами донорських органів є люди, у яких діагностовано смерть мозку. Істотною проблемою є збереження та підтримка функції ізольованого органу в період до його трансплантації, що може становити десятки годин. Це можливо лише шляхом гіпотермії, тривалого охолодження органів до 0°C. Заморожування-обігрів органів не застосовується, так як цей процес істотно пошкоджує їх структуру та функції (див. розділ 5).

Використання гіпотермії є необхідним, оскільки швидкість хімічних реакцій, що відбуваються в організмі, істотно залежить від температури. Чим нижча температура, тим менша швидкість метаболічних реакцій клітин та органу в цілому. Відповідно, потреба в кисні та поживних речовинах у клітин даного органу знижується. А час, який може витримати цей орган за відсутності кровопостачання (ішемії), значно збільшується. При цьому підтримується система міжклітинних взаємодій, повної зупинки метаболізму та функцій не відбувається, що перешкоджає накопиченню шлаків та незворотним порушенням.

Реакція різних органів на гіпотермію індивідуальна, оскільки пов'язана з особливостями будови та клітинного складу. Однак, для більшості органів характерна типова реакція на гіпотермію, що веде до структурно-функціональних порушень.

5. Основні причини ушкоджень органів

- *Ішемія.* Вилучення органів з тіл для подальшої консервації та трансплантації перериває їхнє кровопостачання, внаслідок чого розвивається ішемія. Нормально функціонуючі органи та тканини мають певні потреби в кисні та поживних речовинах, які постачаються зі струмом крові та необхідні для отримання пластичного матеріалу та енергії. Отримані енергія та речовини використовуються для задоволення всіх метаболічних потреб

клітини (синтез білків, ДНК, РНК, ліпідів, полісахаридів, підтримання трансмембранних іонних градієнтів, скорочення м'язів, транспорт речовин та ін.).

- **Енергетичне голодування.** Відсутність кровопостачання унеможливорює тканинне дихання та окисне фосфорирування. Припиняється утворення АТФ та синтетичні процеси. У цьому випадку клітини можуть певний час отримувати енергію у вигляді АТФ анаеробним шляхом у процесі гліколізу. Лактат, нормальний продукт анаеробного окислення глюкози без кровопостачання і, відповідно, гіпоксії, накопичується в клітинах, знижуючи рН всередині клітини, інгібуючи гліколіз та інші метаболічні реакції. У результаті клітина виявляється позбавленою всіх можливостей отримати енергію, необхідну для підтримки життєво-важливих процесів, і поступово гине. Чим вища температура, тим швидше це відбувається. Тому зниження температури зберігання ізолюваних органів чи тканин до 0°C, сприяє збільшенню часу їх переживання.

- **Субстратне голодування.** З припиненням кровопостачання переривається процес надходження поживних речовин в ізолюваний орган. Навіть перфузія глюкозою, амінокислотами та іншими потрібними речовинами в умовах гіпотермії не в змозі повністю усунути дефіцит пластичного матеріалу.

- **Накопичення метаболітів.** Процеси, пов'язані з ішемією, можуть бути посилені підвищенням концентрації шкідливих метаболітів, а також натрію і кальцію всередині клітин. Частково це викликано нестачею АТФ, який необхідний для роботи Na^+/K^+ АТФази, одного з головних іонних переносників, необхідних для підтримки градієнта концентрацій Na^+ і K^+ через плазматичну мембрану.

- **Закислення внутрішнього середовища.** Зниження рН також сприяє порушенню іонного та водного гомеостазу клітин. Це в свою чергу може вести до набухання клітин та пошкодження плазматичних мембран.

- **Підвищення концентрації кальцію.** Крім того, гіпоксія та високі внутрішньоклітинні концентрації Na^+ ведуть до підвищення кількості іонів Ca^{2+} усередині клітин. Це в свою чергу активує різні сигнальні шляхи загибелі клітини шляхом апоптозу чи некрозу.

- **Порушення функцій клітин, клітинних взаємодій та клітинної кооперації.**

- **Реперфузійні ушкодження.** Реперфузія — це відновлення кровотоку при підключенні органу до кровоносних судин, що призводить до збільшення постачання O_2 , інших речовин та видалення продуктів обміну речовин. Після гіпотермічної консервації органів та їх підключення до

кровопостачання утворюються додаткові фактори, що впливають на життєздатність. Ці фактори беруть участь в *ішемічно-перфузійних ушкодженнях* (ІПУ) органу, що трансплантується. Вони розвиваються внаслідок дефектів ендотелію кровоносних судин та порушення їх функцій. ІПУ часто спричиняють затримку або відсутність функції трансплантата на ранніх етапах після трансплантації. Тобто, в процесі консервації та наступної трансплантації спостерігаються не тільки ішемія та пов'язані з нею порушення, а й з'являються ушкодження, викликані реперфузією.

- ***Поява активних форм кисню.*** Реоксигенація органів може сприяти розвитку додаткових ушкоджень. Ішемія призводить до порушення цілісності мітохондріальних мембран, що веде до витоку електронів із електронно-транспортного ланцюга. У присутності O_2 це може вести до формування активних форм кисню (АФК), таких як супероксид радикал (O_2^*). Цей радикал може формувати перекис водню H_2O_2 , який у свою чергу може бути джерелом найбільш небезпечної форми вільних радикалів - гідроксил-радикала ($*OH$). Ці радикали небезпечні насамперед тим, що ведуть до ініціації ланцюгових вільно-радикальних реакцій, які потенційно можуть пошкоджувати різні молекули, особливо органічні, зокрема полімери та ліпіди мембран.

- ***Ушкодження мембран.*** Внаслідок вільно-радикальних реакцій та перекисного окислення ліпідів у біомембранах порушується їх виборча проникність, що призводить до порушення осмотичної рівноваги та набряку органу. Внаслідок пошкодження функцій мембран порушується метаболізм, гомеостаз та відбувається дезорганізація клітинного вмісту.

6. Дія гіпотермії на ферменти та метаболізм

В умовах гіпотермії немає істотних порушень структури та організації клітин, як при заморожуванні. Головне – вода залишається рідкою, хоча в'язкість цитозолу може дещо збільшуватись. При зниженні температури біоб'єктів від оптимальної до $0\text{ }^{\circ}C$ каталітична активність ферментів поступово падає, але їх денатурація при цьому не відбувається. Зниження активності пояснюється зниженням швидкості руху субстратів та зменшенням ймовірності їх потрапляння до активного центру ферментів. З підвищенням температури їхня каталітична активність знову відновлюється. Отже, білки-ферменти можуть функціонувати і легко переносити тимчасове охолодження до кристалізації води, що зумовлює можливість збереження певної активності клітин при гіпобіозі організмів або при зберіганні біоб'єктів в умовах гіпотермії.

Температура є важливим фактором, від якого залежить швидкість всіх ферментативних реакцій (рис. 1). З підвищенням температури швидкість реакцій зростає. Це пов'язано з тим, що з підвищенням температури рух молекул субстратів прискорюється і збільшує ймовірність їх потрапляння в активні центри ферментів. Температура, що забезпечує найбільшу швидкість реакції, називається *оптимальною*. Для більшості ферментів ссавців це температури у діапазоні 30 – 40°C. Підвищення температури вище оптимальної призводить до зниження швидкості роботи ферментів. Це пояснюється змінами, а потім втратою нормальної структури ферментів при підвищених температурах. Тобто ферменти є дуже чутливими молекулами до змін температури. При температурах вище 50°C більшість ферментів тварин піддаються *денатурації* – втрати своєї вихідної структури, що призводить до повної втрати їхньої активності, а значить до порушень метаболізму та функцій клітин.



Рис. 1. Залежність активності ферментів та швидкості ферментативної реакції (V) від температури.

Таким чином, швидкість біохімічних реакцій, що відбуваються в організмі, істотно залежить від температури. Чим нижча температура, тим нижча швидкість метаболічних реакцій клітин та органу в цілому. Відповідно, потреба у кисні та поживних речовинах знижується, а час, який може витримати орган за відсутності кровопостачання (ішемії), суттєво збільшується. Було показано, наприклад, що використання гіпотермії може продовжити час збереження нирки з 30-60 хвилин до 12-13 годин.

7. Середовища та апаратура для гіпотермічного зберігання

Засоби для гіпотермічного зберігання органів повинні мати здатність підтримувати іонний гомеостаз і осмотичний тиск, сприяти енергетичному балансу, містити субстрати та видаляти метаболіти, підтримувати

метаболізм, протистояти АФК та ІПУ. Використання спеціальних середовищ без натрію (або з його низьким вмістом), з високим вмістом калію та магнію (розчини внутрішньоклітинного типу), протидіє накопиченню Na^+ та Ca^{2+} усередині клітин, що при гіпотермічному зберіганні органів може суттєво продовжити їх збереження. Для таких середовищ дуже важлива наявність осмотично активних компонентів (лактобіонат, рафіноза, гідроксиетильований крохмаль, манітол), які запобігають набухання клітин.

Прикладами таких середовищ є (табл. 1), "Euro Collins", UW (University of Wisconsin solution), "Celsior", IGL-1 (Institut Georges Lopez-1 solution), Custodiol НТК, СМР (сахарозо-місткий розчин, розроблений в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України). Додавання антиоксидантів до середовища для гіпотермічного зберігання також може істотно продовжити виживання органу. Використання таких розчинів у принципі може збільшити виживання нирки та підшлункової залози до 72 годин, печінки – до 30 годин. Хоча практично використання цих органів обмежено 4–12 годинами.

Таблиця 1. Склад середовищ для консервації органів (мМоль/л)

	Euro-Collins	UW	Belzer's MPS	HTK	Celsior	Polysol	Custodiol-N
Натрій	9.3	25.0	100	15.0	100	136.0	16.0
Калій	115.1	125.0	25.0	10.0	15.0	5.0	10.0
Магній	4.7	5.0	5.0	4.0	13.0	14.0	8.0
Сальцій			0.5	0.015	0.25	9.0	0.02
Хлор	15.0		1.0	51.03	41.5		30.04
Глюконат			85.0			10.0	
Фосфат	57.6	25.0	25.0			0.8	
Сульфат	4.7	5.0				4.0	
Бікарбонат	9.3					25.0	
Глюкоза	190		10.0			16.0	
Глутатіон		3.0	3.0		3.0	3.0	
Аденозин		5.0				5.0	

Аллопури- ннol		1.0	1.0			1.0	
Рафіноза		30.0					
Лакто- біонат		100			80		
ГЕК*		5%	5%				
Гістидін				180.0	30.0		124.0
Триптофан				2.0			
Альфакето- глутарат				1.0			2.0
Маннітол	32		30.0	30.0	60.0		30.0
Глутамат					20.0		
Рибоза			0.5				
HEPES*			10.0				
Аденін			5.0			5	
Піруват						0.2	
ПЕГ*						1%	
Амінокис- лоти						11.0	
Феноловий червоний						0.07	
N-ацетил- гістидин							57.0
Сахароза							33.0
Аспартат							5.0
Гліцин							10.0
Аланін							5.0
Триптофан							2.0

Аргінін							3.0
Деферок-самін							25.0
LK 614*							7.5

*-ГЕК–гідроксиетилкрохмаль; HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, буфер; ПЕГ – поліетиленгліколь; LK 614 – хелатор заліза.



А



Б

Рис. 2. Машины для перфузії. А. - "Liver Assist" (Organ Assist, Нідерланди); Б. - The metra (OrganOx Limited, Великобританія).

Існує спеціальне обладнання необхідне для забору органів, їх транспортування та гіпотермічного зберігання. Наприклад, установка Бельцера та камера для консервації органу "Вікерс".

На Рис. 2 представлені приклади сучасного обладнання, яке дозволяє перфузувати органи. Такі прилади здатні підтримувати умови близькі до фізіологічних, підтримувати пульсуючий характер перфузії, контролювати температуру та тиск перфузату за допомогою ротаційної помпи. Як правило, такі прилади можуть використовувати будь-які сертифіковані розчини для механічної перфузії.

8. Низькотемпературне зберігання органів та тканин

Існують два основні підходи до гіпотермічного зберігання органів: статичний та динамічний.

Під статичним методом мають на увазі просте зберігання у спеціальному середовищі за низьких позитивних температур (2–4°C) чи *просте гіпотермічне зберігання*.

Динамічний метод – це *гіпотермічна перфузія* органу спеціальними розчинами. Його головною перевагою є поєднання холодового гальмування метаболізму з постійним постачанням органу киснем та поживними речовинами, а також видалення метаболітів.

Просте гіпотермічне зберігання та гіпотермічна перфузія використовуються у клініці тільки для нирок, а для печінки та інших органів застосовують лише просте гіпотермічне зберігання.

Просте гіпотермічне зберігання. Гіпотермічне зберігання органів і тканин стали використовувати із середини минулого століття. Зберігання печінки обмежувалося 6 годинами. Використання сучасних розчинів (Табл. 1) дозволило збільшити термін зберігання до 16 годин і дозволило доставляти органи на великі відстані. Додавання лактобіонату, рафінози, фосфату, сульфату дозволяє нівелювати летальне набухання клітин. Тоді як додавання алопуринолу, глутатіону запобігає розвитку оксидативного стресу.

Використання таких факторів як бичачий нейтрофільний пептид, фактор росту нервів, пептиду Р, епідермального та інсуліноподібного фактора росту збільшило виживання нирки собаки в експерименті до 6 днів. Аналогічні результати були отримані для печінки та серця. Використання цих факторів призвело до поліпшення мітохондріальної функції та запобіганню ранньому розвитку апоптозу.

Однак, незважаючи на певні успіхи у справі гіпотермічного зберігання органів, термін їхнього задовільного зберігання обмежується 10–16 годинами, залежно від виду та вихідного стану об'єкта.

Гіпотермічна перфузія та нормотермічна перфузія

Існують спеціальні машини для нормотермічної чи гіпотермічної перфузії (Рис. 2). Такі машини підтримують певну температуру та

імпульсний характер перфузії, що імітує хвилі тиску, створені серцевим ритмом. Без такого ритму нирки схильні до набухання та руйнування. Цей ритм необхідний для підтримки адекватного тиску в капілярах нирки. Зазвичай для гіпотермічної перфузії використовують розчин Бельцера (Табл. 1).

Гіпо- та нормотермічна перфузія в клініці використовується поки, в основному, тільки для нирки. Однак експериментальні та пілотні клінічні дослідження показують потенційну можливість використання гіпотермічної перфузії та для зберігання печінки. Головною проблемою для зберігання печінки є висока чутливість епітеліальних клітин до гіпотермії.

9. Гіпотермічне зберігання печінки, нирок, серця

Для зберігання та трансплантації використовують трупну печінку безпосередньо після реєстрації смерті або частки печінки, отриману від родинних донорів. Вилучення органів допускається лише у державних лікувально-профілактичних установах, науково-дослідних інститутах, вищих медичних навчальних закладах, центрах, які мають відповідний дозвіл на цей вид діяльності. Печінка промивається розчином UW через печінкові артерії перед вилученням з донора. Після видалення печінка повторно промивається розчином UW і зберігається в розчині при 0-4°C до моменту її використання.

Одержують нирки для трансплантації від родинних донорів чи використання кадаверних органів. Якщо використовують просте гіпотермічне зберігання, відмитий від крові орган поміщають у стерильний поліетиленовий пакет з консервантом. Даний пакет поміщають у пакет зі сніговим шугою і поміщають у крижаний фізіологічний розчин. Транспортування здійснюють у термоконтейнері або холодильнику за температури 4-6°C. Якщо використовують гіпотермічну перфузію, орган підключають до перфузійної машини, яка здійснює постійне пульсаційне промивання органу консервуючим розчином. Перфузування органів проводять одним із консервуючих розчинів: Custodiol, EuroCollins, UW

Для зберігання та трансплантації використовують серце безпосередньо після реєстрації смерті донора.

Традиційний метод. Серце, витягнуте у загиблого донора, промивають фізіологічним розчином натрію хлориду і поміщають в охолоджений фізіологічний розчин. Транспортування органу здійснюється у спеціальному пакеті у контейнері з льодом. При цьому трансплантація має бути проведена

в період від трьох до шести годин після вилучення – інакше серце визнається непридатним.

Перфузійний спосіб. Розроблено спеціальні контейнери, в яких серце підключається до системи штучного кровообігу та продовжує скорочуватися навіть в умовах гіпотермії під час зберігання та транспортування. Для збільшення терміну зберігання органа при перфузії використовується кисень та спеціальні розчини, що консервують. За допомогою такого апарату виживання реципієнтів перевищує 97 відсотків, тоді як при традиційному способі зберігання цей показник становить близько 80 відсотків. У ряді випадків хірурги підтримували належний стан донорського органу понад вісім годин.

10. Гіпотермічне зберігання рогівки

Існує кілька підходів, які дозволяють зберегти рогівку. Усі вони мають свої переваги та недоліки.

Зберігання очного яблука або рогівки від трупного донора по Філатову В.П. (рис.3.): Очне яблуко обробляється дезінфікуючим розчином. Потім поміщається у бюкс із щільно притертою кришкою (волога камера). Бюкс з органом зберігатиметься при температурі промислового холодильника +2 – +4 °C.

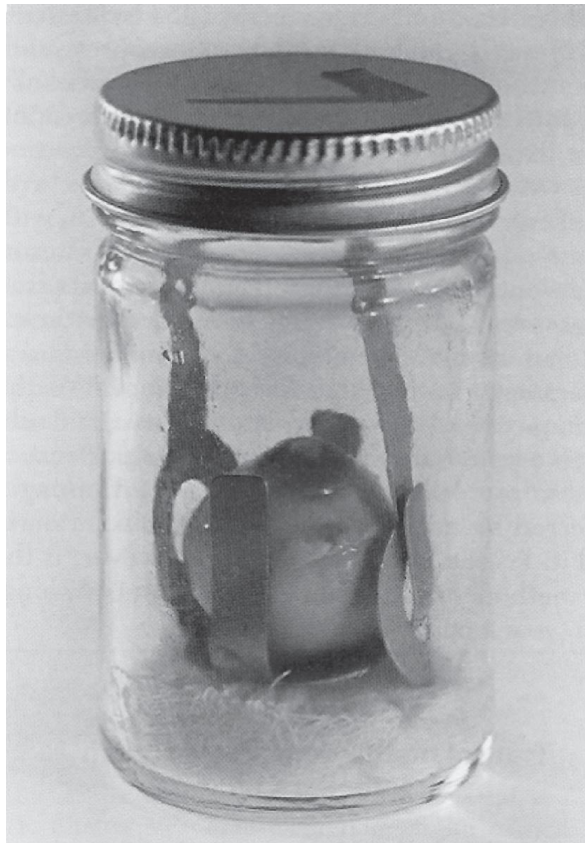


Рис. 3. Зберігання рогівки у вологій камері по Філатову.(з *Niels Ehlers, Jesper Hjortdal, Kim Nielsen. Corneal Grafting and Banking. Bredehorn-Mayr T, Duncker GIW, Armitage WJ (eds): Eye Banking. Dev Ophthalmol. Basel, Karger, 2009, vol 43, pp 1–14).*

Метод дозволяє зберегти рогівку органу від кількох годин до 1-2 діб. Перевагами методу є його дешевизна та простота. Недоліками такого методу є короткий термін зберігання, а також високий ризик контамінації.

Також було показано можливість зберігати рогівку до 7-10 днів за температури 4°C. Для цього рогівку вирізають і поміщають у посудину із середовищем для культивування клітин, антибіотиками та декстраном. Зберігають у холодильнику (4°C).

11. Гіпотермічне зберігання шкіри та кінцівок

Для гіпотермічного зберігання шкіри її інкубують у розчинах гліцерину з концентраціями від 50 до 85% при температурі 33°C протягом 3 годин. Потім зберігають при температурі 2-8 °C не менше 3-х тижнів, що сприяє загибелі бактерій, але не більше двох років. Неодноразово було показано, що наявність життєздатних клітин є не обов'язковою умовою, оскільки трансплантат служить тимчасовим покриттям для ран і головним чином захищає тканини від втрати води, тепла і проникнення патогенної флори.

При травматичній ампутації кінцівки її поміщають у пакет, який зберігається у крижаному розчині. Кінцівка разом із постраждалим пацієнтом якнайшвидше доставляються до медичного закладу для реімплантації.

Першорядне значення для успішної реімплантації відрізаної кінцівки має своєчасне надання першої допомоги постраждалим та виконання необхідних умов зберігання та транспортування ампутованої кінцівки. Вирішальне значення має час від моменту травми до надходження потерпілого до хірургічного відділення. Тривалість зберігання в умовах гіпотермії відсічених пальців становить 16 годин, кисть – 12, передпліччя, плече, стопа, гомілка, стегно – до 6 годин. Зберігання ізольованих кінцівок при температурах вище 4°C істотно скорочує термін їх придатності для трансплантації.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Актуальність гіпотермічного зберігання.
2. Види низькотемпературних ефектів та їх наслідки.
3. Основні фактори пошкодження клітин, тканин та органів у зоні субнульових температур.
4. Методичні підходи при зберіганні органів.
5. Розчини для гіпотермічного зберігання органів.
6. Апаратура для гіпотермічного зберігання органів.
7. Способи оцінки ефективності гіпотермічного зберігання органів.
8. Консервування органів з використанням нормо- і гіпотермічної перфузії.
9. Реперфузійні пошкодження органів.
10. Гіпотермічне зберігання печінки, нирок та серця.
11. Гіпотермічне зберігання рогівки.
12. Гіпотермічне зберігання шкіри та кінцівок.
13. Методи кріоконсервування клітин та фрагментів ендокринних органів. Їх клінічне застосування.
14. Законодавство України щодо трансплантації органів. Протоколи гіпотермічного зберігання органів та тканин, призначених для трансплантації. Провідні центри трансплантації органів та тканин в Україні.
15. Протоколи зберігання тканин донорської крові та кісткового мозку за помірно низьких температур. Способи кріоконсервування клітин донорської та кордової крові, кісткового мозку.
16. Науково-організаційні принципи роботи низькотемпературних банків біологічних об'єктів (НТБ). Роль НТБ у сучасній клінічній медицині та розвитку медичних технологій. Законодавчі та регламентні документи з роботи НТБ України.
17. Особливості структурної організації та роботи низькотемпературних банків, в яких зберігають стовбурові клітини та продукти фетоплацентарного комплексу. Застосування цих кріоконсервованих об'єктів у клінічній практиці.
18. Технології кріоконсервування чоловічих та жіночих статевих клітин, тестікулярної та оваріальної тканин, доімплантаційних ембріонів тканин. Історія розробки та впровадження в клінічну практику програм запліднення «in vitro» та допоміжних репродуктивних технологій.
19. Існуюча в ІПКіК НАН України система профілактики інфікування біологічних об'єктів медичного призначення, які зберігаються в НТБ,

збудниками гемо-перкутаних та інших хвороб. Їх відповідність національним та світовим протоколам.

20. Технології виготовлення, довгострокового зберігання кісткових трансплантатів та їх клінічне застосування.
21. Міжнародне та національне законодавство про депонування біологічних об'єктів. Які об'єкти відносяться до категорії «біологічні об'єкти» та підлягають депонуванню. Міжнародні системи колекцій та банків «біологічних об'єктів». Їх спеціалізація.
22. Клітинні культури. Методи їх культивування та оцінки життєздатності. Технології кріоконсервування клітинних культур. Світові та національні колекції клітинних культур.

ЛІТЕРАТУРА

ОСНОВНА ЛІТЕРАТУРА

1. Білоус А.М. Структурні зміни біологічних мембран при охолодженні / [А.М. Білоус, В.А. Бондаренко]. – К.: Наукова думка, 1982. – 255 с.
2. Кріоконсерванти / [А.М. Білоус, М.І. Шраго, М.С. Пушкарь]. – К.: Наукова думка, 1979. – 196 с.
3. Вода і водні розчини при температурі нижче 0°C / [Під ред. Ф. Франкса]. – К.: Наукова думка, 1985. – 388 с.
4. Актуальні проблеми кріобіології / Під ред. А.М. Гольцева. – Харків: ІПКіК НАН України, 2012. – 767 с.
5. Основи кріобіології та кріомедицини/ під редакцією Г.Ф. Жегунова та О.А. Нардида.Х.:ФЛП–2019.–616 с.
6. Білоус А.М. Заморожування і кріопротекція / [А.М. Білоус, О.А. Гордієнко., Л.Ф. Розанов]. – М.: Вища. шк., 1987. – 90 с.
7. Білоус А.М. Кріобіологія / А.М. Білоус, В.І. Грищенко. – К.: Наукова думка, 1984. – 431 с.
8. Гордієнко Є.О., Пушкарь М.С. Фізичні основи низькотемпературного консервування клітинних суспензій. – К.: Наукова думка, 1994. – 144 с.
9. Кріоконсервування клітинних суспензій / [А.О. Цуцаєва, В.А. Аграненко, Л.І. Фьодорова та ін.; Під ред. А.О. Цуцаєвої]. – К.: Наукова думка, 1983. – 240 с.
10. Кріобіологія і біотехнологія / [А.О. Цуцаєва, В.Г. Попов, К.М. Ситнік та ін.; Під ред. А.О. Цуцаєвої] – К.: Наукова думка, 1987. – 216 с.
11. Фуллер Б, Грін К., Грищенко В.І. Кріоконсервування для створення банку клітин: сучасні концепції на рубежі ХХІ сторіччя // Проблеми кріобіології. – 2003. – №2. – С.62 – 83.
12. Холодовий стрес і біологічні системи / Цуцаєва А.О., Мікулинський Ю.Є., Висеканцев І.П. та ін. – Київ: Наук.думка, 1991. – 176 с.
13. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E. Life in a frozen state. – Boca Raton? Florida: CRC Press, 2004. – 672 p.
14. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46(3). – P. 205 – 229.
15. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kuryliuk A.L., Bozhok G.A. Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below –60°C // Cryobiology. – 2011. – Vol. 62, №2. – P.107–114.
16. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Polyakova A.L., Legach E.I., Bozhok G.A. The development of the cell cryopreservation protocol with controlled rate thawing // Cell and Tissue Banking. – 2016. – Vol. 17, №2. – P. 303 – 316.

Допоміжна література

1. Лозіна-Лозінський Л. К. Нариси з кріобіології. – Л.: Наука, 1972. – 288 с.
2. Вплив кріопротекторів на біологічні системи / [Т.М. Юрченко, В.Ф. Козлова, Б.А. Скорняков та ін.]. – К.: Наукова думка, 1989. – 240 с.

3. Осташко Ф. І. Біотехнологія відтворення великої рогатої худоби – К.: Аграрна наука, 1995. – 184 с.
4. Петренко Ю. О. Кріоконсервування клітин ембріональної печінки людини з використанням ДМСО та високомолекулярних полімерів // Проблеми кріобіології. – 2003. – № 3. – С. 80-87.
5. Aragval A. Manual of Assisted Reproductive Technologies and Clinical Embryology. 2012. – Medicine Health Books. – 900 p.
6. Carnevale G., A., Riccio M. et al. Optimized Cryopreservation and Banking of Human Bone-Marrow Fragments and Stem Cells // Biopreserv Biobank. – 2016 . – Vol.14, №2. – P.138-148.
7. Cameron AM, Barandiaran Cornejo JF. Organ preservation review: history of organ preservation // Curr Opin Organ Transplant. – 2015. – Vol.20,№2. – P.146-151.
8. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation / Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1066:119-135.
9. Embrionic stem cells – Differentiation and Pluripotent Alternatives. Edited by M.S. Kallos, INTECH, 2011.- 506 p.
10. Leibo SP, Pool TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes // Fertil Steril. - 2011 . – Vol.96, №2. – P.269-276.
11. Meryman H.T. Cryoprotective agent: A review // Cryobiology. – 1971. – №8. – P.173–183.
12. Pogozhykh O., Prokopyuk V., Figueiredo C., Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. Stem Cells Int 2018; Article ID 4837930.
13. Liu D, Pan F. Advances in cryopreservation of organs. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2016 Apr;36(2):153-161.
14. Scott K. , Lecak J., Acker J. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. Transfus Med Rev. 2005 Apr;19(2):127-42.
15. Valeri CR, Ragno G. Cryopreservation of human blood products. Transfus Apher Sci. 2006 Jun;34(3):271-87.
16. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars. Early Hum Dev. 2018;126:6-9. doi:10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016.

Петренко О.Ю.
Жегунов Г.Ф.
Прокопюк О.С.
Чиж М.О.
Пахомов О.В.
Глоба В.Ю.
Божкова Ю.О

ГІПОТЕРМІЧНЕ ЗБЕРІГАННЯ ОРГАНІВ

Методичні рекомендації для самостійної роботи
аспірантів 1 курсу

галузь знань 22 Медицина

спеціальність 222 Медицина

Дисципліна «Технології кріоконсервування і тривалого зберігання
біологічних об'єктів для клінічного застосування»