

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Козлова В. А., Покровская М. С., Мешков А. Н., Драпкина О. М.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ТРАНСПОРТИРОВКЕ БИООБРАЗЦОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава РФ, 101990, Москва, Россия

Для получения биологических образцов высокого качества в процессе биобанкирования для дальнейшего использования в научно-исследовательской работе, в лабораторных исследованиях необходимо учитывать влияние способа транспортировки на их сохранность. Рассмотрено влияние жидкого азота, сухого льда, аккумуляторов холода на биологические показатели, даны рекомендации для уменьшения влияния способов замораживания и хранения на качество биобразцов. Жидкий азот обеспечивает наилучшую сохранность образцов, однако, при их транспортировке сухой лёд используется гораздо чаще. При транспортировке некоторых типов клеток при помощи сухого льда необходимо использовать криопротекторы CryoStor CSI, Cell Banker 1. Сухой лёд может оказывать влияние как на pH жидких биобразцов, так и на коагулогические показатели плазмы крови. Проникновение CO₂ в образец ведёт к изменению показателей ПТВ и АЧТВ, к снижению уровня протеина С и фибриногена при определённых условиях. Во избежание изменения коагулогических параметров образцы сыворотки и плазмы крови, подвергнутые воздействию сухого льда более 16 часов, должны быть разморожены открытыми при комнатной температуре, либо находиться при температуре –80°С в течение 24 ч. Применение аккумуляторов холода недопустимо для длительной транспортировки сыворотки и плазмы крови, содержащих нестабильные биомаркёры, из-за недостаточно низкой температуры (повышение с течением времени до –25°С и выше). В качестве аккумуляторов холода низких температур (до –80°С) могут использоваться металлические гранулы, но они не являются настолько же эффективными, как сухой лёд, т. к. он способен удерживать требуемую температуру гораздо дольше.

Ключевые слова: контроль качества; транспортировка биобразцов; биобанкирование; жидкий азот; сухой лёд; преаналитические переменные; криоконсервация; биологические образцы.

Для цитирования Козлова В. А., Покровская М. С., Мешков А. Н., Драпкина О. М. Современные подходы к транспортировке биобразцов при низких температурах. Клиническая лабораторная диагностика. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 619-625. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625>

Kozlova V.A., Pokrovskaya M.S., Meshkov A.N., Drapkina O.M.

ACTUAL APPROACHES TO THE TRANSPORTATION OF BIOLOGICAL SAMPLES AT LOW TEMPERATURES

FSI National Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia

Taking into account the impact of shipment method of biosamples is necessary for obtaining high-quality biological samples in biobanking and laboratory research. The impact of liquid nitrogen, dry ice and cold accumulators on the quality of biological markers was considered, as well as recommendations to reduce the impact of these methods of shipment. The liquid nitrogen provides the best preservation of samples, however, dry ice is used much more often during their transportation. When transporting certain types of cells using dry ice, there is the way to use CryoStor CSI and Cell Banker 1 cryoprotectors. The dry ice has a significant effect on both the pH of liquid biological samples and the coagulological parameters of plasma samples. The penetration of CO₂ into the sample leads to changes in the parameters of PTT and APPT, as well as to decrease the protein C and fibrinogen level under certain conditions. Serum and plasma samples exposed to dry ice for more than 16 hours should be thawed open at room temperature, or instead of it should be kept at –80 °C for 24 hours to avoid changes in coagulation parameters. The use of cold accumulators is unacceptable for long-term shipment of serum and plasma containing unstable biomarkers because of insufficiently low temperature (increase over time to –25 °C and above). Besides, metal pellets can be used as cold storage batteries at low temperatures (up to –80 °C), but they are not as effective as dry ice, since it is able to hold the required temperature for much longer.

Key words: quality control; transportation of biological samples; biobanking; liquid nitrogen; dry ice; preanalytical variables; cryopreservation; biological samples.

For citation: Kozlova V.A., Pokrovskaya M.S., Meshkov A.N., Drapkina O.M. Actual approaches to the transportation of biological samples at low temperatures. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics); 2020; 65 (10): 619-625 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625>

For correspondence: Kozlova V.A., research assistance of Biobank; e-mail: vkozlova2905@gmail.com

Information about authors:

Kozlova V.A. <https://orcid.org/0000-0002-3843-6980>
Pokrovskaya M.S. <https://orcid.org/0000-0001-6985-7131>
Meshkov A.N. <https://orcid.org/0000-0001-5989-6233>
Drapkina O.M. <https://orcid.org/0000-0002-4453-8430>

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 20.05.2020
Accepted 25.05.2020

Введение. Для получения достоверных результатов любого лабораторного исследования, необходимо учитывать ряд преаналитических факторов, влияющих на качество биоматериала. Все процедуры в биобанке выполняются строго по принятым стандартам, в противном случае может снизиться качество биообразцов [1]. Для выработки и дальнейшего применения стандартов в биобанкировании важным является исследование влияния преаналитических переменных на биологические образцы.

Среди наиболее значимых преаналитических факторов существенную роль играет транспортировка биологических образцов, которая требует мониторинга таких параметров, как тип образца, температура транспортировки, материал и прочность упаковки [2], время года и день транспортировки [3].

Наиболее устойчивые условия для сохранения биологических жидкостей, жизнеспособности и функциональности клеток обеспечиваются с помощью хранения и транспортировки их в жидком азоте [3]. Температура жидкого азота составляет -196°C , что значительно ниже температуры стеклования воды, все биохимические и фотодинамические реакции останавливаются, что обуславливает высокую эффективность использования жидкого азота. Несмотря на ряд исследований, подтверждающих высокую эффективность жидкого азота для длительного хранения и транспортировки биологических образцов, в частности, таких нестабильных, как сыворотка и плазма крови, шире всего в качестве хладообразующего элемента при перевозке используют сухой лёд (твёрдый диоксид углерода, CO_2). Сухой лёд (-79°C) имеет ряд преимуществ по сравнению с жидким азотом в широком использовании: он не считается опасным или токсичным для курьеров, не нуждается в специальных ёмкостях для хранения, может использоваться в обычном пенопластовом контейнере. Сухой лёд дешевле жидкого азота. Так как морозильные камеры с температурой -80°C часто используются для хранения биоматериала, образцы, транспортируемые на сухом льду, могут быть помещены в морозильную камеру по прибытии без скачков температур, возникающих при их транспортировке из одного хранилища в другое. Большое число транспортных компаний используют контейнеры с сухим льдом, но только немногие занимаются перевозками с жидким азотом [4].

В качестве хладоэлементов могут применяться и различные смеси фазоизменяемых материалов, в состав которых входят как гидрогели, так и солевые растворы. Подобные материалы способны удерживать нужную температуру в течение нескольких часов, однако, данным способом нельзя транспортировать нестабильные биологические субстанции, такие как плазма и сыворотка крови, т. к. подобные холодовые элементы дают недостаточно низкие температуры ($+8...-25^{\circ}\text{C}$) [5].

В обзоре представлены результаты анализа литературы на предмет влияния различных хладообразующих элементов, используемых для поддержания температурного режима во время транспортировки биоматериала, на параметры биологических образцов и на результаты лабораторных исследований, проводимых на биообразцах, достоинства и недостатки каждого из методов транспортировки биоматериала при заданной температуре.

Замораживание биообразцов. Большинство биологических жидкостей представляют собой сложные смеси, в состав которых входят растворы солей и белков в воде в разных концентрациях, благодаря чему существует большой диапазон температур замерзания различных биоматериалов. Во время замораживания вода преобразуется в форму льда, отделяя от себя растворённые вещества, белки и даже клетки. Образец полностью не затвердевает до тех пор, пока в оставшейся незамерзшей фракции жидкости не образуется эвтектика или стеклование. Наличие внеклеточного матрикса влияет на затвердевание воды. Хранение образцов на температурах, при которых в образцах присутствует жидкая вода (по сравнению с замороженной или остекленевшей водой), ведёт к снижению стабильности биомаркёров.

Хранение и транспортировка в жидком азоте. Жидкий азот – азот в жидкой форме, его молекулы состоят из двух атомов, связанных друг с другом ковалентными химическими связями. Жидкий азот имеет низкую температуру, его точка кипения составляет $-195,79^{\circ}\text{C}$ [6]. Хранится жидкий азот в специальных контейнерах, в которых контролируется внутреннее давление. Контейнеры, рассчитанные на малый объём жидкого азота от 2 до 50 литров, называются сосуды Дьюара. В практике крупных криохранилищ используются криогенные сосуды ёмкостью от 28 до 2000 литров. Жидкий азот используют в качестве резервного источника холода в автоматизированных системах хранения.

Для хранения и транспортировки образцов в жидком азоте используются специальные криопробирки. Во время замораживания в пробирке может снижаться давление воздуха. Степень разрежения воздуха зависит напрямую от разницы между объёмом пробирки и объёмом биообразца. При хранении пробирок в жидком азоте он может проникать в пробирку в объёме равном объёму разрежения. При оттаивании пробирок, азот из жидкой фазы переходит в газообразную и вызывает повышение давления внутри пробирки. В результате пробирка может разорваться. Загрязнённый азот, проникающий в пробирку, может повредить клеточный материал образца. При хранении и транспортировке образцов в жидком азоте используются специальные криопробирки, заполнять которые необходимо строго до отметки. Криопробирки, предназначенные для хранения клеток, образцов тканей, растворов (различного жидкого биоматериала), выпускаются с двумя типами крышек – с

внешней и внутренней резьбой. Криопробирка с внутренней резьбой имеет силиконовое кольцо. Использование пробирок с внутренней резьбой и силиконовым кольцом снижает риск их повреждения.

Биологические образцы рекомендуется хранить не в самом жидком азоте, а в его парах [7]. Это необходимо в том числе для того, чтобы исключить процесс перекрестной контаминации – загрязнения образцов биологического материала. Наиболее безопасным является способ хранения биоматериала в криопробирках с силиконовым кольцом в газообразном азоте.

Криоконсервация клеток. Замораживание при сверхнизких температурах, или криоконсервация осуществляется при температуре -196°C , при помещении капсулы с биологическими объектами в жидкий азот. Реже используются более высокими температурами (от -180 до -130°C), которые создают электрифицированные морозильные камеры, но данный температурный режим менее надёжен и подходит не для всех объектов. Использование низких температур обеспечивает остановку биохимических процессов в клетках, в том числе останавливается обмен веществ и энергией с внешней средой, благодаря чему живые объекты могут сохраняться долгое время [8, 9]. Использование низких температур может привести к гибели живых объектов, если не осуществлять специальные защитные меры. Основными повреждающими факторами при замораживании являются образование внутриклеточного льда, характерное для большой скорости охлаждения (более 10 К/мин), обезвоживание клетки, характерное для небольшой скорости охлаждения (менее 10 К/мин). В криобиологии повреждение, получаемое клеткой при замораживании, называют «криоповреждением».

При низких температурах происходит кристаллизация воды. Эти кристаллы при размораживании разрушают большое число клеток. Качество и количество клеток, полученных после оттаивания, остается неудовлетворительным, несмотря на наличие различных методов замораживания клеток, использования криопротекторов (ДМСО, CryoStor CS10, трегалоза, этиленгликоль и т. д.) и разработку различных защитных эмульсий [3, 10].

Для сохранения жизнеспособности клеток необходимо замораживать их медленно, после смешивания клеток с криопротектором. Для этого используют специальную камеру, обеспечивающую их постепенное замораживание на -70°C в течение 1-2 дней, затем переставляют в жидкий азот. Размораживание клеток с наименьшими потерями происходит на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ [11].

Широкое распространение криоконсервация получила в ЭКО-технологии [12] и [13] и в ветеринарии для сохранения жизнеспособных половых клеток и получения здорового потомства [14, 15]. Репродуктивные клетки перевозят с помощью небольшого, специально разработанного контейнера с парами жидкого азота. Контейнер автономно может поддерживать температуру -196°C до трёх недель.

В парах жидкого азота долговременно хранятся не только разнообразные клетки и ткани человека и животных, но и образцы семян редких и исчезающих растений [16]. Жидкий азот применяется в банкировании клеток и тканей от пациентов с редкими заболеваниями для длительного хранения и последующего проведения крупномасштабных исследований. Распространено банкирование пуповинной крови в качестве потенциального

источника гемопоэтических стволовых клеток и самих стволовых клеток [17].

Влияние жидкого азота, сухого льда и температуры хранения на лабораторные показатели биообразцов. Данные о влиянии жидкого азота и сухого льда на жизнеспособность клеток и лабораторные показатели противоречивы. В биобанке Люксембурга сравнивали влияние сухого льда и жидкого азота на жизнеспособность и качество клеток РМВС и Jukart [3]. Жизнеспособность и тех и других клеток, находившихся в жидком азоте, на порядок выше, чем таких же клеток, подверженных влиянию сухого льда. Авторы утверждают, что оптимальным и экономичным способом транспортировки мононуклеарных клеток, хранящихся в жидком азоте, является транспортировка с помощью сухого льда и криопротектора CryoStor.

Сравнивали влияние температурного режима хранения клеток. Показано, что пролиферация клеток печени, хранящихся без криопротектора в жидком азоте, сильно снижалась при помещении их в морозильную камеру при температуре -80°C на сутки [18]. Жизнеспособность клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека и нормальных эндотелиальных клеток сонной артерии крупного рогатого скота, хранящихся в течение 8 лет с криопротектором Cell Banker 1 при температуре -80°C , остаётся такой же, как при хранении в жидком азоте (90%) [19].

Изучено, как использование жидкого азота и хранение в морозильных камерах -20°C , -70°C может оказывать влияние на коагулогические показатели [20]. Сравнили показатели протромбинового времени (ПТВ), активированного частичного тромбoplastинного времени (АЧТВ), фибриногена в плазме крови от 16 здоровых пациентов при следующих режимах:

- Режим 1. Хранение на -20°C ;
- Режим 2. Хранение на -20°C , предварительная быстрая заморозка в жидком азоте;
- Режим 3. Хранение на -70°C ;
- Режим 4. Хранение на -70°C , предварительная заморозка жидким азотом.

Все образцы хранились от 1 до 4 месяцев. При режиме 2 наблюдались наименьшие расхождения с незамороженными свежими образцами в значениях ПТВ и АЧТВ. На показатели ПТВ и АЧТВ сильно влиял способ заморозки. Эти значения увеличены больше всего в образцах, не обработанных жидким азотом и хранящихся при температуре -20°C . Наименьшие изменения по сравнению с контролем происходили в образцах с мгновенной заморозкой в жидком азоте перед хранением на температуре -70°C (режим 4).

Что касается фибриногена, метод замораживания и хранения, по-видимому, оказывает лишь минимальное влияние на результаты анализа. Различия между свежими и замороженными образцами плазмы крови незначительны, статистически значимые изменения наблюдаются после двух и более месяцев хранения. Различия ниже двух процентов во всех случаях.

Помещение образцов плазмы крови на короткое время в жидкий азот перед хранением на -70°C или транспортировкой обеспечивает дополнительную стабилизацию некоторых коагулогических параметров.

Транспортировка с применением сухого льда. Сухой лёд – твёрдая двуокись углерода (CO_2). В отличие от обычного льда, образующегося при 0°C и ниже, сухой лёд имеет очень низкую температуру (-79°C). Су-

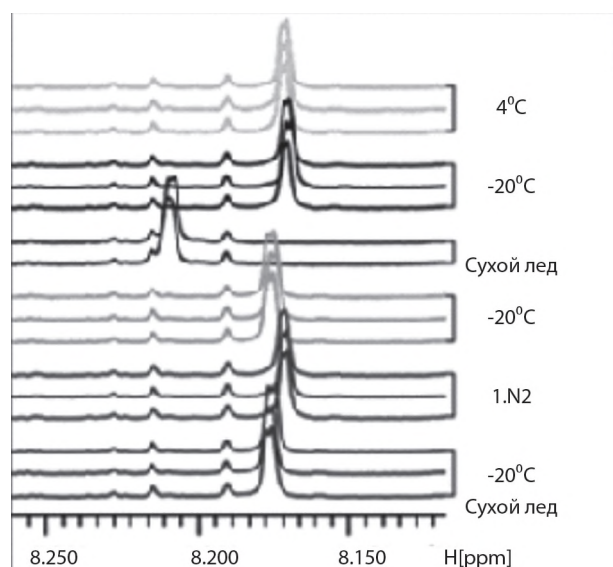


Рис. 1. Зависимость ЯМР спектров от способа хранения [24].

хой лёд не тает, а сублимируется (переходит из твёрдого состояния в газообразное) с выделением CO_2 . При растворении в воде он понижает pH раствора, образуя углекислоту. Самая распространённая форма использования сухого льда – pellets (цилиндрические стержни диаметрами от 3 до 16 мм) [21].

Работа с сухим льдом должна проводиться с соблюдением всех мер техники безопасности, т. к. сухой лёд – криогенный материал, способный вызывать обморожение, а CO_2 может замещать воздух в помещении, вызывая удушье.

При сублимации сухого льда с образованием углекислого газа возникает микроокружение с усиленной конвекцией, т. е. направленным движением молекул газа. Этот эффект усиливает теплопередачу к любому веществу, помещённому в такую среду. Результатом является ускоренный прогрев криогенных образцов до температуры сухого льда (-78°C). Это увеличение температур является существенным, если перед транспортировкой образцы хранили в жидком азоте, так как сухой лёд примерно на 90°C теплее, чем среда хранения паров жидкого азота. Непосредственный контакт стенок криогенных пробирок с сухим льдом вызывает усиленную теплопередачу через прямое столкновение молекул со стенками криопробирки.

Влияние сухого льда на pH биообразцов. Сухой лёд меняет pH, понижая его, и делая среду более кислой в образцах плазмы и мочи [22-24]. Предположительно, данное явление вызвано диффузией CO_2 в образец через плохо закрытые крышки, через полипропилен [22], что ведёт к последующему образованию углекислоты. При температуре ниже -40°C CO_2 [22] не проникает в образцы; следовательно, диффузия CO_2 в образцы происходит при их оттаивании после нахождения на сухом льду.

При исследовании влияния воздействия сухого льда на pH получены следующие результаты. Образцы цитратной плазмы от 30 здоровых добровольцев, выдержанные на сухом льду в течение 24 ч непосредственно перед экспериментом, показывали статистически значимо более низкий средний pH (6.13) по сравнению со свежемороженой плазмой (7.16) и образцами, хранящимися на

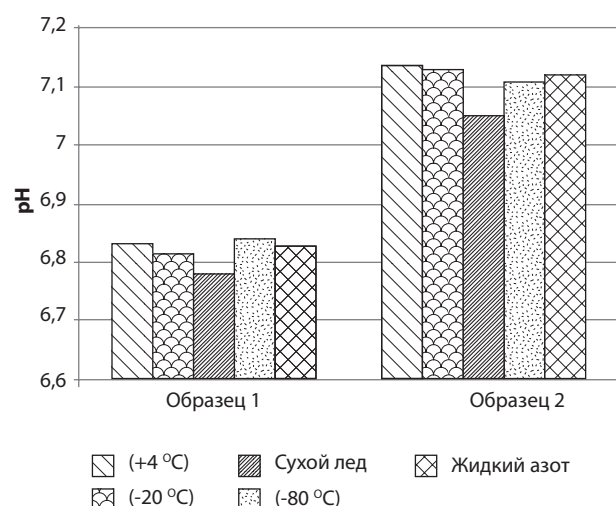


Рис. 2. Зависимость показателя pH от способа хранения [24].

-20°C (7.42) в течение того же времени. При помещении образцов после сухого льда в морозильную камеру на -80°C на 24 ч pH практически восстанавливается до первоначального значения (7.36), нивелируя последствия воздействия сухого льда на образцы плазмы [25].

В раннее опубликованной работе представлены похожие результаты, доказывающие влияние сухого льда на понижение pH плазмы крови [23]. Рассматривались 3 режима хранения цитратной плазмы от 8 здоровых добровольцев.

- Режим 1. хранение на -20°C в течение 8 дней перед анализом.
- Режим 2. хранение на -20°C в течение 3 дней с последующим хранением в течение суток в пластиковом контейнере с сухим льдом и дальнейшим помещением образцов на -20°C на 4 дня.
- Режим 3. хранение в течение 3 сут на -20°C , 24 час на сухом льду, 4 дня на -80°C .

Нахождение цитратной плазмы в течение суток на сухом льду снижало pH на 1.2 (режим 2 – среднее значение pH – 6,12) по сравнению с -20°C (режим 1 среднее значение pH – 7,32). При последующем хранении на -80°C , pH возрастало (режим 3 среднее значение pH – 7,42).

Исследовано влияние сухого льда на образцы мочи при помощи метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) [24]. Сравнили спектры ЯМР образцов мочи, подвергнутых воздействию сухого льда, и спектры образцов, замороженных в жидком азоте, при температурах -80°C , -20°C , $+4^\circ\text{C}$ (контроль) в течение 24 час (рис. 1, 2.) [24]. В спектрах замечены изменения в зависимости от процедуры замораживания, образцы, замороженные на сухом льду, демонстрируют наибольшие сдвиги пиков по сравнению образцами контроля (рис. 1) [24].

Наблюдаемые различия в положении пиков в спектрах ЯМР в большей степени объясняются изменениями кислотности, показатель pH наименьший в образцах, подвергнутых воздействию сухого льда (рис. 2). Подобные результаты связаны с проникновением углекислого газа в образцы и образованием углекислоты, и понижением pH.

Проверено, связано ли проникновение углекислого газа в образцы мочи с использованием полипропиленовых пробирок, которые пропускают многие газообраз-

Коагулологические параметры в зависимости от режима хранения плазмы крови

Параметр	Свежая плазма	Плазма, хранящаяся при -20°C	Плазма, хранящаяся при -20°C , затем помещённая в сухой лёд на 24 ч	Плазма хранящаяся на -20°C , затем помещённая на сухой лёд на 24 ч, и перед изучением помещённая на -80°C на 24 ч
ПТВ, с	0.96 (0.86-1.14)	0.97 (0.85-1.11)	1.03 (0.88-1.20)	0.98 (0.86-1.11)
АЧТВ, с	31.70 (26.30-37.90)	31.20 (26.90-38.00)	44.85 (30.30-65.60)	31.60 (26.70-38.90)
Фибриноген, г/л	2.76 (1.84-4.51)	2.80 (1.94-4.81)	2.44 (1.60-3.90)	2.74 (1.84-4.66)
С-протеин, %	111.00 (84.00-150.00)	109.50 (87.00-148.00)	100.00 (77.00-137.00)	108.50 (86.00-146.00)
S-протеин, %	104.65 (53.10-133.10)	108.90 (55.90-136.40)	103.80 (55.10-131.10)	106.70 (53.60-132.10)
Антитромбин, %	114 (95-130)	114 (94-131)	112 (97-131)	108 (98-129)

ные вещества. Данную гипотезу проверили, сравнив образцы мочи, алиquotированные в различные полипропиленовые криопробирки, стеклянные флаконы с завинчивающейся крышкой, герметично запечатаны стеклянные трубки.

Образцы хранили при температуре -20°C , -80°C , $+4^{\circ}\text{C}$ и на сухом льду в течение от 16 ч до 2,5 дней. Спектры ЯМР в образцах, замороженных в полипропиленовых криопробирках на сухом льду демонстрировали существенные отклонения от контрольных ($+4^{\circ}\text{C}$) и хранящихся в морозильных камерах (-20°C , -80°C), в то время как в образцах, замороженных в стеклянных пробирках с завинчивающимися крышками замечены лишь незначительные изменения, в образцах, замороженных в герметичных стеклянных пробирках практически полностью отсутствовали сдвиги пиков.

Различия в значениях pH между образцами, хранящимися в разных условиях, слабее в стеклянных флаконах с завинчивающимися крышками и отсутствуют в герметичных стеклянных пробирках.

Рекомендовано, чтобы образцы, подвергнутые воздействию сухого льда, оттаивали без крышки на комнатной температуре [23, 25, 26]. Данное действие чревато ошибками при использовании большого количества проб. Вместо этого можно поместить образцы после хранения на сухом льду на температуру -80°C на 24 ч для предотвращения подкисления и изменения показателей в последующих анализах [25].

Влияние сухого льда на показатели коагулометрии. При определённых условиях сухой лёд может менять не только pH, но и некоторые коагулологические показатели биологических образцов.

Показано существенное увеличение протромбинового времени (ПТВ), активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ), уменьшения концентраций фибриногена и протеина С при нахождении образцов плазмы в течение 24 час на сухом льду [25] (табл. 1, [25]).

Если в отношении увеличения ПТВ есть подтверждение в других работах [23], [27] данные в отношении АЧТВ, фибриногена, протеина С существенно расходятся с результатами других авторов, которые не описывают каких-либо существенных изменений в данных показателях при воздействии сухого льда [26]. Не описаны и изменения pH. Существенное значение имеет то, что одни исследователи [25] держали образцы на сухом льду в течение 24 час, в то время как другие [26] только в течение 16 час. Возможно, 16 часов недостаточно для того, чтобы вызвать подкисление образца и статистиче-

ски значимые изменения в коагулологических параметрах. Очевидно время, в течение которого плазма крови подвержена воздействию сухого льда, влияет на pH и коагулологические параметры.

Неизвестно, существует ли связь непосредственно между pH и показателями коагулометрии, но продемонстрировано, что понижение pH с 7.6 до 5 совпадает с увеличением ПТВ и АЧТВ. Активность фибриногена остаётся стабильной при pH в интервале от 7.6 до 6, но начинает падать при pH ниже 6 [27].

Можно рекомендовать транспортировать образцы, предназначенные для проведения коагулологических исследований, при помощи жидкого азота или на сухом льду не более 16 часов. При транспортировке с сухим льдом более 16 ч необходимо обеспечить размораживание биообразцов при комнатной температуре без крышки не менее 10 мин, либо поместить их перед размораживанием на -80°C на сутки.

Другие подходы к транспортировке биообразцов. Одним из широко используемых средств для перевозки биоматериалов являются медицинские термоконтейнеры, в объёме которых поддерживается определенная температура. Линейка термоконтейнеров широкая – от простейших до высокотехнологичных, включая термоконтейнеры, заправляемые жидким азотом и поддерживающие температуру не выше -150°C , электрические термоконтейнеры, не требующие использования хладоэлементов. Их существенным недостатком является высокая стоимость (табл. 2).

Широко применяются термоконтейнеры с использованием хладоэлементов, которые предварительно помещают в холодильную или морозильную камеру перед укладкой в сумку-холодильник [28].

Задача хладоэлемента – термостатирование изотермической системы, т. е. поглощение или выделение энергии, компенсирующей внешнее воздействие. Накопление термической энергии идёт за счёт фазового перехода вещества (формирование или разрушение кристаллической решетки). Самым распространённым наполнителем для хладоэлементов является вода или гели на основе воды (температура плавления 0°C). Низкая стоимость и высокая теплота плавления делают хладоэлементы на водной основе крайне эффективными. Укладка замороженных водных хладоэлементов со всех сторон термоконтейнера ведёт к падению внутренней температуры до 0°C .

Хладоэлементы на основе воды неэффективны для создания отрицательных температур. Хладоэлементы с наполнителями, отличными от воды или водных гелей,

Рекомендации по транспортировке биообразцов

Показатель	Жидкий азот (-196 °С)	Сухой лёд (-50...-70 °С)	Высокотехнологичные термоконтейнеры (-150...-25° С)	Сумки-холодильники с хладоэлементами (-25...+8° С)
Достоинства	Обеспечивает наибольшую сохранность биологических образцов	Широко используется при транспортировке при низких температурах. Низкая стоимость. Не требует специальной утилизации. Не обязательна обратная отправка контейнера	Долго сохраняет нужную температуру. Не токсично. Не требует специальной техники безопасности. Многоразовое использование	Не токсично. Не требует специальной техники безопасности. Многоразовое использование. Низкая стоимость
Недостатки	Опасен при использовании. Требует сложного обслуживания и больших финансовых затрат	Класс повышенной опасности из-за обильного выделения CO ₂ и низкой температуры. Необходимы меры предосторожности. Может влиять на pH жидких биообразцов (сыворотка/плазма крови, моча) и исказить коагулологические параметры	Высокая стоимость. Подходит только для генетических исследований. Необходимо возвращать контейнер отправителю	Транспортировка при заданной температуре непродолжительное время
Тип биообразца	Клеточные культуры, клетки (соматические, половые), ткани, ранние эмбрионы	Свежезамороженная плазма, сыворотка крови, донорская кровь, некоторые лекарственные препараты	Цельная кровь, форменные элементы крови. ДНК, биологические материалы для генетических исследований, некоторые лекарственные препараты	

содержат вещества с температурой фазового перехода, соответствующей нужному температурному диапазону. Теплота плавления таких наполнителей не выше -30° С [5]. Они могут поддерживать подобный температурный режим более 96 час. Подобные условия транспортировки подходят, когда не требуется более низкий диапазон температур: для образцов цельной крови, лейкоцитарной плёнки, выделенной ДНК, биоматериала для генетических экспериментов, в случаях транспортировки сыворотки для анализа нестабильных биомаркёров, необходимо обеспечить более низкие температуры с помощью сухого льда или жидкого азота.

Замороженные камни. В качестве искусственной альтернативы сухому льду могут быть использованы два типа материалов: металлически гранулы камня, широко используемых в банях и саунах (А) и металлические шары, используемых в аквариумах (В). Они могут находиться в морозильной камере при температуре -80° С и сохранять её некоторое время. В эксперименте в качестве испытуемой охлаждаемой жидкости использовалась смесь 50% этанола с водой [30]. Материалы А и В показывали похожие результаты и позволяли охлаждаться раствору несколько быстрее, чем это наблюдалось с сухим льдом. Температура 0° С в растворе достигалась при использовании исследуемых материалов немногим больше 100 сек, при охлаждении сухим льдом – лишь после 150 сек. Более медленное охлаждение с сухим льдом происходит из-за слоя сублимированного CO₂, который окружает каждую гранулу сухого льда. Поскольку сухой лёд при нагревании претерпевает фазовый переход и дольше удерживает температуру -80° С, он более пригоден для транспортировки, чем подобные криоматериалы [30].

Выводы. Наилучшее качество биообразцов обеспечивается с помощью хранения и транспортировки в парах жидкого азота. Это объясняется сверхнизкими температурами замораживания (-196°С) и полным замедлением биохимических процессов в клетках. Перевозка биологических образцов с помощью жидкого азота связана с рядом технологических трудностей и его высокой стоимостью.

Среди рассмотренных способов транспортировки биологических образцов сухой лёд является наиболее

востребованным благодаря дешевизне, возможности удерживать достаточно низкие температуры длительное время. Необходимо учитывать следующие особенности сухого льда. Он влияет на pH жидких биообразцов, в частности, мочи и плазмы крови. Проникновение CO₂ в образец происходит через стенки полипропиленовых пробирок, и при его оттаивании при температуре выше -40° С. Это ведёт к закислению среды биообразцов вследствие образования углекислоты. Изменяется ряд коагулологических показателей (увеличение ПТВ и АЧТВ, снижение уровней протеина С и фибриногена) после нахождения образцов на сухом льду более 16 час в полипропиленовых пробирках. Для восстановления pH биообразцов после длительного контакта с сухим льдом (более 16 ч) необходимо, чтобы образцы размораживались без крышки при комнатной температуре, либо находились при температуре -80°С в течение 24 ч. В случае использования стеклянных пробирок при хранении на сухом льду проникновение CO₂ в биообразцы минимально.

Стабилизирующее влияние на коагулологические показатели оказывает предварительная быстрая 5-минутная заморозка образцов плазмы крови в жидком азоте перед длительной транспортировкой на сухом льду.

Сухой лёд не может обеспечить того качества клеток, которое обеспечивает жидкий азот. Транспортировка некоторых типов клеток при помощи сухого льда в присутствии определённых криопротекторов обеспечивает жизнеспособность клеток, близкую к таковой при хранении в жидком азоте [3, 19].

В ситуациях, когда биологические образцы транспортируются для исследования стабильных биомаркёров, для хранения которых не требуются более низкие температуры, допускается применение аккумуляторов холода (хладоэлементов). Хладоэлементы не являются токсичными, могут быть использованы несколько раз, обладают невысокой стоимостью. В качестве аккумуляторов холода низких температур, близких к температурам сухого льда, могут использоваться замороженные металлические гранулы. Их нельзя использовать при длительных транспортировках, так как они быстро теряют заданную температуру.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (2-4, 8-11, 13-15, 18-20, 22-27, 30 см. REFERENCES)

1. Сивакова О.В., Покровская М.С., Ефимова И.А., Мешков А.Н., Метельская В.А., Драпкина О.М. Контроль качества образцов сыворотки и плазмы крови для научных исследований. *Профилактическая медицина*. 2019; 22(5): 91-7.
5. Сайт: Компания ВебПак – URL: <https://webpack.ru/> (дата обращения 27.04.2020).
6. Сайт: Википедия/Жидкий азот – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Жидкий_азот (дата обращения 20.04.2020).
7. Сайт: Институт регенеративной медицины МГУ – URL: <http://irm.msu.ru/subdivisions/cryobank/> (дата обращения 1.05.2020).
12. Сайт: Центр Репродукции и Генетики – URL: <https://www.fertimed.ru/> (дата обращения 15.04.2020).
16. Нестерова С.В., Яшина С.Г. Криоконсервация семян некоторых редких и декоративных растений флоры Дальнего Востока. Биофизика живой клетки. *Криоконсервация генетических ресурсов в проблеме сохранения биоразнообразия*. 1994; 6: 91-3.
17. Сайт: Гемабанк – URL: <https://gemabank.ru/> (дата обращения 10.05.2020).
21. Сайт: Компания Elme Messer – URL: <http://www.elmemesser.ru/> (дата обращения 15.05.2020).
28. Сайт: Термоконтeйнер.ру – URL: <https://www.termokonteiner.ru/> (дата обращения 10.05.2020).
29. Сайт: Термологика – URL: <https://termologika.ru/> (дата обращения 10.05.2020).

REFERENCES

1. Sivakova O. V., Pokrovskaya M. S., Efimova I. A., Meshkov A. N., Metelskaya V. A., Drapkina O. M. Quality control of serum and plasma samples for scientific research. *Profilakticheskaya medicina*. 2019; 22(5): 91-7. (in Russian)
2. Hmel P. J., Kennedy A., Quiles J. G., Gorogias M., Seelbaugh J. P., Morrisette C. R et al. Physical and Thermal Properties of Blood Storage Bags: Implications for Shipping Frozen Components on Dry. *Transfusion*. 2002; 42(7): 836-46.
3. Kofanova O., Davis K., Glazer B., De Souza Y., Kessler J., Betsou F. Viable Mononuclear Cell Stability Study for Implementation in a Proficiency Testing Program: Impact of Shipment Conditions. *Biopreservation and Biobanking*. 2014; 12(3): 206-16.
4. Raspa M., Guan M., Paoletti R., Montoliu L., Ayadi A., Marschall A. Dry ice is a reliable substrate for the distribution of frozen mouse spermatozoa: A multi-centric study. *Theriogenology*. 2017; 96: 49-57.
5. WEB: WebPack Company – URL: <https://webpack.ru/> (last accessed 27.04.2020). (in Russian)
6. WEB: Liquid nitrogen – URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Жидкий_азот (last accessed 20.04.2020). (in Russian)
7. WEB: Institute for Regenerative medicine – URL: <http://irm.msu.ru/subdivisions/cryobank/> (last accessed 1.05.2020). (in Russian)
8. Stacey G. N., Day J. G. Putting cells to sleep for future science. *Nature biotechnology*. 2014; 32(4): 320-2.
9. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970; 168: 939-949.
10. Dluska E., Metera A., Markowska-Radomska A., Tudek A. Effective Cryopreservation and Recovery of Living Cells Encapsulated

- in Multiple Emulsions. *Biopreservation and Biobanking*. 2019; 17(5): 468-76.
11. Klebe R. J., Mancuso M. G. Identification of New Cryoprotective Agents for Cultured Mammalian Cells. *In Vitro*. 1983; 19: 167-70.
12. WEB: IVF&Reproductive Genetics Center – URL: <https://www.fertimed.ru/> (last accessed 15.04.2020). (in Russian)
13. Amesse L., Srivastava G., Uddin D., Pfaff-Amesse T. Comparison of Cryopreserved Sperm in Vaporous and Liquid Nitrogen. *The Journal of reproductive medicine*. 2003; 48(5): 319 – 24.
14. Amstislavsky S. Y., Trukshin I. S. Cryobanking mammalian embryos: priorities and the optimal choice of reproductive technologies. *Russian journal of developmental biology*. 2010; 41(1): 13-23.
15. Riggs R., Mayer J., Dowling-Lacey D., Chi T.-F., Jones, E., Oehninger, S. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertility and Sterility*. 2010; 93(1): 109-15.
16. Nesterova S. V., Yashina S. G. Cryopreservation of seeds of some rare plants of the flora of the Far East. *Biophysics of living cell. Cryopreservation of genetic resources in the problem of biodiversity conservation*. 1994; 6: 91-3. (in Russian)
17. WEB: Гемабанк – URL: <https://gemabank.ru/> (last accessed 10.05.2020). (in Russian)
18. Kilbride P., Gonzalez-Molina J., Maurmann N., Mendonça da Silva J., Gibbons S., Selden C., et al. Impact of Storage at -80 °C on Encapsulated Liver Spheroids After Liquid Nitrogen Storage. *Bio-Research Open Access*. 2016; 5(1): 146-54.
19. Miyamoto Y., Ikeuchi M., Noguchi H., Hayashi S. Long-term Cryopreservation of Human and other Mammalian Cells at -80 °C for 8 Years. *Cell Medicine*. 2018; 10: 1-7.
20. Alesci S., Borggreffe M., Dempfle C.-E. Effect of freezing method and storage at -20 °C and -70 °C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thrombosis Research*. 2009; 124(1): 121-6.
21. WEB: Elme Messer Company – URL: <http://www.elmemesser.ru/> (last accessed 15.05.2020). (in Russian)
22. Murphy B.M., Swarts S., Mueller B.M., Geer P., Manning M.C., Fitchmun M.I. Protein instability following transport or storage on dry ice. *Nature Methods*. 2013; 10(4): 278-9.
23. Odsæter I. H., Lian I. A., Bratberg K., Mikkelsen G. Dry Ice Exposure of Plasma Samples Influences pH and Lupus Anticoagulant Analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2015; 53(5): 809 – 13.
24. Rist M. J. Influence of freezing and storage procedure on human urine samples in NMR-based metabolomics. *Metabolites*. 2013; 3(2): 243-58.
25. Trondsetås L. M., Lian G., Alsos I. The effects of dry ice exposure on plasma pH and coagulation analyses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017; 57(1): 59-64.
26. Gosselin R. C., Honeychurch K., Kang H. J., Dwyre, D. M. (2015). Effects of storage and thawing conditions on coagulation testing. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2015; 37(4): 551-9.
27. Chaimoff C., Creter D., Djaldetti M. The effect of pH on platelet and coagulation factor activities. *American Journal of Surgery*. 1978; 136(2): 257-9.
28. WEB: Термоконтeйнер.ру – URL: <https://www.termokonteiner.ru/> (last accessed 10.05.2020). (in Russian)
29. WEB: Термологика – URL: <https://termologika.ru/> (last accessed 10.05.2020). (in Russian)
30. Ismalaj T., Sackett, D. L. An inexpensive replacement for dry ice in the laboratory. *Analytical Biochemistry*. 2015; 474(1): 38-9.

Поступила 20.05.2020

Принята к печати 25.05.2020