

Кріозахисна ефективність середовищ на основі оксиетильних похідних поліолів при заморожуванні еритроцитів людини

UDC 547.42:612.111:615.014.41

А.М. КОМПАНИЕЦЬ*, О.В. НИКОЛЕНКО, В.В. ЧЕКАНОВА, Ю.С. YESIPOVA

Cryoprotective Efficiency of Media Based on Oxyethyl Derivatives of Polyols During Freezing of Human Erythrocytes

Досліджували схоронність еритроцитів людини при заморожуванні в залежності від складу кріозахисного середовища. Встановлено, що кріозахисні середовища на основі оксиетильних похідних гліцерину і метилцелозольву, які містять сахарозу і маніт, підвищують схоронність еритроцитів після кріоконсервування.

Ключевые слова: схоронність еритроцитів, кріоконсервування, оксиетильні похідні поліолів, кріозахисні середовища.

Исследовали сохранность эритроцитов человека при замораживании в зависимости от состава криозащитной среды. Установлено, что криозащитные среды на основе оксиэтильных производных глицерина и метилцелозольва, содержащие сахарозу и маннит, повышают сохранность эритроцитов после криоконсервирования.

Ключові слова: сохранность эритроцитов, криоконсервирование, оксиэтильные производные полиолов, криозащитные среды.

The survival of human erythrocytes during freezing depending on cryoprotective medium composition has been investigated. It has been established that cryoprotective media based on glycerol and methyl cellosolve oxyethyl derivatives, containing sucrose and mannite, increase the survival of erythrocytes after cryopreservation.

Key-words: erythrocyte survival, cryopreservation, oxyethyl derivatives of polyols, cryoprotective media.

Перспективним напрямком в дослідженнях кріоконсервування еритроцитів є розробка і створення композиційних багатоконпонентних кріозахисних середовищ на основі непроникаючих кріопротекторних сполук, які не потребують відмивання [1, 4, 5].

Мета роботи – вивчення кріозахисної ефективності середовищ різного складу на основі оксиетильних похідних гліцерину і метилцелозольву при заморожуванні еритроцитів.

Матеріали і методи

Еритроцити отримували з донорської крові людини, яку заготовляли на гемоконсерванті “Глюгіцир” і зберігали після експфузії не більше 2-х діб при 4°C.

Досліджували кріозахисні середовища на основі оксиетильних похідних гліцерину зі ступенем заміщення $n=25$ і $n=30$ (ОЕГ _{$n=25$} і ОЕГ _{$n=30$}), а також оксиетильованого метилцелозольву (ОЕМЦ). Розчини кріопротекторів готували в 20 і 30%-х концентраціях на фізіологічному розчині NaCl: були досліджені кріозахисні середовища з додаванням 2% цитрату натрію, 3% сахарози, 5% маніту і 5% глюкози. Для визначення оптимального складу кріозахисних середовищ еритроцити з’єднували з

кріоконсервантами у співвідношенні 1:1, заморожували в металевих контейнерах ємкістю 2 мл у рідкому азоті. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 40°C протягом 40 с.

Ступінь збереження еритроцитів після заморожування-відігрівання оцінювали за показниками гематокриту, осмотичної крихкості у 0,6 і 0,9% розчинах NaCl, а також гемолізу [2]. Тонічність кріозахисних середовищ визначали на осмометрі ОМК-1Ц.

Результати та обговорення

Досліджена дія розчинів ОЕГ _{$n=25$} і ОЕГ _{$n=30$} та оксиетильованого метилцелозольву на еритроцити людини на етапі експозиції в залежності від складу кріозахисного середовища. Після 30–60 хв експозиції еритроцитів з кріозахисними розчинами показники осмотичної крихкості в фізіологічному розчині NaCl, відсоток гемолізу знаходилися на рівні контролю, тобто показників інтактних еритроцитів. Варто зазначити, що незалежно від використаного кріопротектора (ОЕГ _{$n=25$} , ОЕГ _{$n=30$} і ОЕМЦ) введення в кріозахисне середовище глюкози призвело до незначного гемолізу після 30–60 хв експозиції в суспензії клітин в 0,6%-му розчині NaCl.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Результати збереження еритроцитів людини, кріоконсервованих з кріозахисними середовищами на основі сполук ряду поліолів, приведені в таблиці.

Аналіз отриманих даних показав, що схоронність еритроцитів після кріоконсервування залежить від складу кріозахисного середовища.

Введення в кріозахисне середовище цитрату натрію при заморожуванні еритроцитів з ОЕГ_{n=25}, ОЕГ_{n=30} незалежно від концентрації використаного кріопротектора знижувало збереженість еритроцитів як за рівнем гемолізу, так і за показниками осмотичної крихкості в 0,9 та 0,6% розчинах NaCl (таблиця).

Введення в кріозахисне середовище глюкози і маніту підвищувало рівень гемолізу та показники осмотичної крихкості розморожених еритроцитів після їх внесення у гіпотонічне середовище (0,6% NaCl) на фоні низьких показників осмотичної крихкості в 0,9% NaCl, що, очевидно, пов'язано з дією осмотичного фактора. Введення сахарози в

кріозахисне середовище незалежно від концентрації використаного кріопротектора сприяло підвищенню збереженості розморожених еритроцитів, найбільш вираженому при додаванні сахарози до 30%-го розчину ОЕГ_{n=30}.

При заморожуванні еритроцитів з 30%-м розчином оксиметилцелозольву на фоні низького рівня гемолізу (1,2–2,3%), що відповідає цілісності в середньому 98% клітин, встановлено високі показники осмотичної крихкості, найбільш виражені при додаванні до 30%-го розчину ОЕМЦ цитрату натрію і глюкози, що може свідчити про латентні пошкодження мембрани клітин у процесі заморожування-відігрівання, які виявляються після перенесення еритроцитів в ізотонічне та гіпотонічне середовища. При використанні 20%-го розчину ОЕМЦ для заморожування еритроцитів, навпаки, на фоні зростання рівня гемолізу після розморожування еритроцитів знижується їх осмотична крихкість після перенесення в ізотонічне середовище незалежно від складу

Вплив кріозахисних середовищ на схоронність еритроцитів людини

Склад середовища (кінцева концентрація кріопротекторів 15%)	Тонічність середовища, мОсоль/кг	Осмотична крихкість у розчинах NaCl, %		Гемоліз, %	Гематокрит, %	
		0,9% NaCl	0,6% NaCl		до заморожування	після заморожування
ОЕГ _{n=30} + фізіологічний розчин	747	17,2±1,1	24,6±1,8	1,4±1,0	26,0±1,3	26,0±1,0
ОЕГ _{n=30} + маніт	1000	13,4±1,0*	18,7±1,5*	1,2±1,4	26,1±0,2	21,6±1,0
ОЕГ _{n=30} + глюкоза	976	19,7±1,5	55,5±1,7	2,5±1,0	26,0±0,5	20,5±1,0
ОЕГ _{n=30} + сахароза	637	13,0±1,2*	18,2±1,5*	1,6±0,5	27,0±1,6	27,0±1,2
ОЕГ _{n=30} + цитрат натрію	962	20,0±1,3*	27,4±1,4*	3,4±1,4*	23,0±1,0	21,0±1,6
ОЕГ _{n=25} + фізіологічний розчин	830	11,0±1,3	18,2±1,0	3,7±1,1	25,4±0,3	26,0±2,0
ОЕГ _{n=25} + маніт	1110	12,00±0,02	17,1±2,4	3±0,05	27,4±1,0	21,2±2
ОЕГ _{n=25} + глюкоза	979	11,0±1,8	80,0±2,0*	11,0±1,0*	28,2±3,0	20,8±1,2
ОЕГ _{n=25} + сахароза	762	13,8±1,6	17,6±3,0	2,7±0,8	28,0±1,6	27,0±2,0
ОЕГ _{n=25} + цитрат натрію	1061	52,0±2,0*	55,0±4,0*	5,5±2,5*	22,0±2,0	20,0±1,0
ОЕМЦ + фізіологічний розчин	708	37,1±1,1	57,0±1,5	1,2±0,5	29,0±3,0	28,00±0,05
ОЕМЦ + маніт	855	21,0±2,5*	53,5±0,5*	3,0±0,6	22,0±2,0	26,00±0,05
ОЕМЦ + глюкоза	969	37,5±0,1	82,0±3,5*	4,3±0,3*	28,0±4,0	27,2±1,0
ОЕМЦ + сахароза	907	28,0±0,1*	50±0,5*	1,4±0,2	29,0±0,1	31,0±0,5
ОЕМЦ + цитрат натрію	634	42,0±1,3*	62,5±2,5*	2,6±0,1	28,0±1,0	27,3±0,1

Примітка: * – p<0,05 розбіжності вірогідні відносно середовищ, які містять фізіологічний розчин.

кріозахисного середовища. Кращі результати за всіма показниками при заморожуванні еритроцитів були отримані в кріозахисному розчині ОЕМЦ з додаванням маніту і сахарози.

Висновки

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що для збереження еритроцитів людини в процесі заморожування-відігрівання важливе значення має склад кріозахисного середовища. Його вплив визначається не тільки видом кріопротектора, але й додаванням електролітів (NaCl, цитрат натрію), а також вуглеводів (глюкоза, сахароза, маніт), які виконують мембраностабілізуючу функцію [3].

Найбільш ефективними при кріоконсервуванні еритроцитів під захистом оксиетильних похідних гліцерину і оксиетильованого метилцелозольву за показниками гемолізу і осмотичної крихкості в 0,9 і 0,6% розчинах NaCl виявилися кріозахисні середовища, які містили вуглеводи – сахарозу і маніт.

Аналіз отриманих даних виявив, що незалежно від використання кріопротектора введення в кріоза-

хисне середовище сахарози і маніту є сприятливим фактором для кріоконсервування еритроцитів.

Література

1. *Компаниец А.М., Николенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П.* Кріоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 561–565.
2. *Меньшиков В.В.* Лабораторные методы исследования в клинике.– М., 1987.– С. 115–119.
3. *Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Aurell Wistrom C.* Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars // Biochem. J.– 1987.– Vol. 242, N1.– P. 1–10.
4. *Quan G., Zhang L., Guo Y. et al.* Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreserved at –80°C in the presence of polyvinyl pyrrolidone and human serum albumin // CryoLetters.– 2007.– Vol. 28, N2.– P. 95–108.
5. *Sputtek A., Kuehnl P., Rowe A.W.* Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes // Transfus. Med. Hemother.– 2007.– Vol. 34, N4.– P. 262–267.

Надійшла 21.07.2008