

Что мы еще не знаем о криоконсервированных эритроцитах?

А.Ю. ГОРСКАЯ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Е.Д. ЛУЦЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков***What Else We Do Not Know About Cryopreserved Erythrocytes?**

GORSKAYA A.YU., GOLTSEV A.N., LUTSENKO E.D.

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

Проведен сравнительный анализ модификации иммуногенных свойств сингенных эритроцитов, подвергнутых тепловой обработке и криоконсервированию, по их способности индуцировать в организме экспериментальных животных аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА). Установлен факт появления иммуногенных свойств у сингенных эритроцитов после всех видов указанной предобработки. В сравнительном аспекте показано, что максимально выраженный иммунный ответ на сингенные эритроциты в виде продукции аутоантител (ААТ) наблюдается после их тепловой обработки при 49,5°C. Эритроциты, криоконсервированные с 30%-м глицерином, обладали менее выраженными иммуногенными свойствами, чем прогретые, однако подобно эритроцитам, криоконсервированным с ПЭО-1500, они индуцировали развитие аутоиммунной реакции примерно у 50% мышей -реципиентов. Полученные результаты свидетельствуют о модификации антигенного спектра эритроцитов под действием факторов криоконсервирования. Возможно, модификация мембранных структур эритроцитов является следствием реализации эффекта замораживания-отогрева, поскольку влияние на этот процесс криопротекторов "в чистом виде" минимально.

Ключевые слова: аутоиммунная гемолитическая анемия, криоконсервирование, эритроциты, иммуногенность.

Проведено порівняльний аналіз модифікації імуногенних властивостей сингенних еритроцитів після теплової обробки або криоконсервування за їх здатністю індукувати в організмі експериментальних тварин аутоімунну гемолітичну анемію. Установлено факт появи імуногенних властивостей у сингенних еритроцитів після всіх видів обробки. У порівняльному аспекті показано, що максимально виражена імуногенна відповідь на сингенні еритроцити у вигляді продукції аутоантитіл спостерігається після їх теплової обробки при 49,5°C. Еритроцити, криоконсервовані з 30%-м глицерином, мали менш виражені імуногенні властивості, ніж прогріті, однак подібно до еритроцитів, криоконсервованих з ПЕО-1500, вони індукували розвиток аутоімунної реакції у 50% мишок-реципієнтів. Отримані результати свідчать про модифікацію антигенного спектру еритроцитів під впливом факторів криоконсервування. Можливо, модифікація мембранных структур еритроцитів є наслідком реалізації ефекту заморожування-відігріву, оскільки вплив на цей процес криопротекторів "у чистому вигляді" мінімальний.

Ключові слова: аутоімунна гемолітична анемія, криоконсервування, еритроцити, імуногенність.

The authors performed a comparative analysis of modification of immunogenic properties of syngeneic heat-treated and cryopreserved erythrocytes on their ability to induce autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in an organism of experimental animals. There was established the fact of appearance of immunogenic properties in syngeneic erythrocytes after all types of the mentioned pre-treatment. In a comparative aspect it has been shown that maximum manifested immune response to syngeneic erythrocytes as the production of autoantibodies (AABs) is observed after their heat treatment at 49.5°C. The erythrocytes, cryopreserved with 30% glycerol had less manifested immunogenic properties than those heated, but similar to the erythrocytes cryopreserved with PEO-1500, they induced the development of autoimmune reaction approximately in 50% of mice-recipients. Obtained results testify to a modification of antigenic spectrum of erythrocytes under the effect of cryopreservation factors. The modification of erythrocyte membrane structures is likely the result of realization of the freeze-thawing effect, since the influence of cryoprotectants on this process as "it is" is minimal.

Key-words: autoimmune hemolytic anemia, cryopreservation, erythrocytes, immunogenicity.

Вопрос, вынесенный в название статьи, сам по себе "оригинален" настолько, насколько банальна фраза: "Что мы знаем о себе?". Те, кто только начинает познавать "криобиологический" эритроцит, ответят сразу и однозначно: "Все". Те, у кого за плечами десятилетия упорного сражения за попытку вторгнуться в его "святая-святых", ответят более реально: "Мало, очень мало". Действительно, чем больше мы пытаемся распознать внутреннее состояние (intrinsic state) криоконсервированного эритроцита (и не только криоконсервированного), тем больше понимаем, что наши знания об этом – лишь надводная часть айсберга,

The question, representing the paper title, is as an 'original' by itself as the phrase "What do we know about ourselves?" is trite. Those who just have started to explore "cryobiological" erythrocyte will answer at once: "everything". Those who have fought persistently for decades to intrude into its "holy of holies", will answer more really: "too few, very few".

Actually, the more we try to discover an intrinsic state of cryopreserved erythrocyte (and not only cryopreserved), the more we understand that our knowledge is just above-water part of an ice berg, and the rest is to be known. In this paper we tried to broach not the characteristics of "inner" potential of

Адрес для корреспонденции: Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-10-39, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Goltsev A.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721039, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

а остальное еще предстоит узнать. В данной работе мы попытались прикоснуться не столько к характеристикам “внутреннего” потенциала криоконсервированных эритроцитов, сколько к их “внешним” особенностям.

В самых различных экстремальных ситуациях, при невероятно широком спектре развивающихся в организме патологических состояниях трансфузия криоконсервированных эритроцитов остается универсальным методом “поддерживающей терапии” в широком смысле этого слова [4]. Среди огромного количества работ по изучению особенностей влияния различных условий криоконсервирования на те или иные параметры эритроцитов определенную долю занимают те, в которых изучается поведение эритроцитов после введения в кровеносное русло реципиента. В частности, активность миграции, способность переносить кислород, вероятность разрушения и т.д.

Надо сказать, что любое состояние организма, сопровождающееся преждевременным распадом эритроцитов, характеризуется как гемолитическая анемия (ГА) [5].

Этот вид патологии до настоящего времени представляет собой серьезную проблему и остается предметом пристального внимания исследователей различных медико-биологических специальностей. Гемолитические анемии делятся на две большие группы: наследственные, развивающиеся в результате различных генетических дефектов эритропоэза, при которых эритроциты становятся функционально неполноценными и легко разрушаются; и приобретенные, связанные с воздействием различных факторов, способствующих разрушению эритроцитов (образование аутоантител (ААТ), гемолитические яды, механические воздействия и прочее) [5,6].

Наиболее часто встречающимся заболеванием среди приобретенных ГА является аутоиммунная гемолитическая анемия. Данная форма заболевания связана с появлением в организме больного антител (АТ) к собственным эритроцитам, т.е. ААТ. В этом случае эритроциты либо разрушаются в кровеносном русле в тройственной системе: эритроцит + ААТ + комплемент, либо агглютинируют, фагоцитируются и подвергаются распаду в клетках моноцитарно-макрофагальной системы [8].

Использование антиглобулинового метода позволило получить данные о характере нарушения гуморального звена иммунитета, специфичности и агрессивности ААТ, определяющих различия патогенеза и течения клинических форм АИГА [9].

Постулаты классической иммунологии выделяют ряд главных факторов инициации и поддер-

cryopreserved erythrocytes but rather their “outer” peculiarities.

Under very different extreme situations with quite a versatile spectrum of developing in an organism pathological states the transfusion of cryopreserved erythrocytes has remained an universe method of “supporting therapy” in a wide meaning of this word [4]. Among a huge number of investigations of the effect peculiarities of various cryopreservation conditions on these or those parameters of erythrocytes a certain share is devoted to those where there is a study of erythrocyte behavior after introduction into blood channel of a recipient. In particular, these are migration activity, capability to carry an oxygen, the probability of destruction.

It should be mentioned that any organism state accompanying with untimely decay of erythrocytes is characterized as hemolytic anemia (HA) [5].

This type of pathology up to now is a serious problem and has remained the object of intent attention of researchers of various medical and biological specialties. Hemolytic anemias are divided into two big groups: inherent, developing as a result of various genetic defects of erythropoiesis, under which erythrocytes became functionally inferior and easily destroyed; and acquired ones related to the influence of various factors, contributing to the destruction of erythrocytes (formation of autoantibodies (AABs), hemolytic poisons, mechanical effects etc.) [5, 6].

The most spread disease among acquired HAs is autoimmune hemolytic anemia. This disease form is related to the appearance of antibodies (ABs) to own erythrocytes in a patient’s organism, that is AABs which are either destroyed in blood channel in triple system: erythrocyte+AABs+complement, or in the majority of cases agglutinate and phagocyte and are subjected to the decay in the cells of monocyte-macrophage system [8].

Usage of antiglobulin method allowed the obtaining of the data about the character of immunity humoral link impairment, specificity and aggressiveness of AABs, determining the differences of pathogenesis and the proceeding of clinical AIHA forms [9].

Postulates of classic immunology underline some main factors of initiation and maintaining of autoimmune pathology. By extrapolating some of them to the causes of AIHA development, it should be noted that in addition to the formation of somatic mutations of antibody-forming cells, stipulating the formation of AABs to the antigens of erythrocytes, that formation for ABs to autoantigen at AIHA may be related to the change in antigen structure of cell membrane and release of latent antigen epitopes. This phenomenon is explained as “epitope distribution” [9]. It is known that at AIHA the antibodies may be targeted to basic protein, responsible for the transport of anions in

жания аутоиммунной патологии. Экстраполируя некоторые из них на причины развития АИГА, следует сказать, что помимо формирования соматических мутаций антителообразующих клеток, обуславливающих образование ААТ к антигенам эритроцитов, формирование АТ к аутоантигену при АИГА может быть связано с изменением антигенной структуры клеточной мембраны и освобождением скрытых антигенных эпитопов. Данный феномен трактуется как “эпитопное распространение” [9]. Известно, что при АИГА антитела могут быть направлены к основному белку, ответственному за транспорт анионов в мембране эритроцитов, – гликопротеину полосы 3 [7]. Модификация антигенного спектра мембран эритроцитов лежит в основе экспериментальных моделей индукции АИГА. Например, при АИГА, вызванной агентом метилдофа, кроме анти-Rh антиэритроцитарных ААТ, обнаружены АТ к актину и ядерным структурам [5,9]. Другой метод инициации АИГА, а именно введение прогретых до температуры 49,5°C аутоэритроцитов (сингенных) также основан на принципе модификации под действием теплового фактора антигенного спектра мембран эритроцитов с появлением новых для них иммуногенных свойств [6].

Для криобиологии и криомедицины концептуально важным является вопрос возможности структурных перестроек “иммуногенных” комплексов мембраны эритроцитов после криоконсервирования. Известны особенности поведения в кровеносном русле реципиента эритроцитов, криоконсервированных по различным программам [2]. Однако не имеется достаточной информации о том, насколько изменяются их иммуногенные свойства и, если это так, то какова значимость такого рода изменений в сохранении структурно-функциональной полноценности инфузировавшихся эритроцитов. Не исключено, что воздействие на эритроциты определенных режимов криовоздействия может быть использовано в экспериментальных исследованиях как методический подход к модификации их иммуногенных свойств и, таким образом, выступать в роли predisposing фактора инициации АИГА. Цель работы - изучить влияние различных режимов криоконсервирования на иммуногенные характеристики эритроцитов в системе *in vivo* у мышей.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышках-самках линии C57BL, 5-месячного возраста, средней массой 18 г. Животные были разделены на 6 групп, которым вводили: 1 – нативные сингенные эритроциты, предварительно отмытые 3 раза при 3000 об/мин в течение 5 мин по общепринятой

erythrocyte membrane: band-3 glycoprotein [7]. Modification of erythrocyte antigen spectrum is in the base of experimental models of AIHA induction. For instance, under AIHA initiation caused by the agent Methyl dopa, besides of anti-Rh antierythrocyte AABs, there were found ABs to actine and nucleated structures [5, 9]. Another method of AIHA initiation namely introduction of heated up to 49.5°C antierythrocyte AABs (syngeneic) as well is based on the principle of modification under the heat factor effect of erythrocyte membrane antigen spectrum with the appearance of new for them immunogenic properties [6].

For cryobiology and cryomedicine the question about structural rearrangements of erythrocyte membrane “immunogenic” complexes after cryopreservation is important as a conception. There are known the peculiarities of behavior in recipient’s blood channel of erythrocytes, cryopreserved according to different programmes [2]. However there is no sufficient information about the fact how these immunogenic properties are changed and if so, what is the value of these changes in preserving structural and functional integrity of infused erythrocytes. Maybe the influence on erythrocytes of certain cryoeffect regimens can be used in experiments as methodical approach to modification of their immunogenic properties and to act as predisposing factor of AIHA initiation. The aim of the research is to study the effect of different cryopreservation regimens on immunogenic characteristics of erythrocytes *in vivo* in mice.

Materials and methods

The experiments were performed in C57BL female mice, aged 5 months, with an average mass of 18g. The animals were divided into 6 groups, which were introduced with: 1 – native syngeneic erythrocytes, preliminarily washed-out 3 times at 3000 rot/min for 5 min according to traditional methods [1]; 2 – syngeneic erythrocytes, preliminarily heated at 49.5°C for 30 min; 3 – erythrocytes, cryopreserved according to the methods [2] under PEO-1500 protection in 30% concentration without washing-out of cryoprotectant after thawing; 4 – erythrocytes cryopreserved under glycerol protection under 30% concentration, with three-fold washing-out of cryoprotectant after thawing according to the method [1]. The animals of the 5th and 6th groups were injected with syngeneic erythrocytes which were not subjected to freezing, but were exposed with PEO-1500 for 40 min at 0°C or glycerol for 20 min at room temperature (similar to the procedure before freezing), correspondingly.

These groups were used as the control of possible modification of erythrocyte immunogenic activity under cryoprotectants’ effect only. The erythrocytes were intraperitoneally introduced in the amount of 3×10^9 cells per mouse in 0.5 ml.

методике [1]; 2-й – сингенные эритроциты, предварительно прогретые при температуре 49,5°C в течение 30 мин; 3-й – эритроциты, криоконсервированные по методике [2] под защитой ПЭО-1500 в 30%-й концентрации без отмывки от криопротектора после размораживания; 4-й – эритроциты, криоконсервированные под защитой глицерина в 30%-й концентрации, с 3-кратной отмывкой от криопротектора после размораживания по методике [1]. Животным 5- и 6-й групп вводили сингенные эритроциты, которые не подвергали замораживанию, но экспонировали соответственно с криопротектором ПЭО-1500 в течение 40 мин при температуре 0°C, или с глицерином в течение 20 мин при комнатной температуре (подобно процедуре перед замораживанием). Эти группы были использованы в качестве контроля возможной модификации иммуногенной активности эритроцитов под влиянием только криопротекторов. Эритроциты вводили внутривенно однократно в количестве 3×10^9 на мышь в объеме 0,5 мл.

Эритромассу общим объемом 1,8 мл замораживали в полиэтиленовых ампулах Corning Incorporated (США) до температуры -196°C быстрым погружением ампул в жидкий азот. Оттаивание производили на водяной бане при температуре 42-44°C с постоянным встряхиванием ампулы до исчезновения льда.

Контроль за образованием противозритроцитарных ААТ с помощью прямой реакции Кумбса осуществляли на 13-е сутки после введения эритроцитов [6].

Для объективизации полученных данных при достаточно большом количестве показателей и возможности сравнения обобщенного эффекта модификации иммуногенности эритроцитов в разных группах нами был предложен такой интегральный показатель, как потенциал иммуногенности эритроцитов (ПИЭ), представляющий собой сумму баллов по каждой оцениваемой величине.

Расчет ПИЭ. Титр ААТ: каждое следующее разведение увеличивается на 10 баллов: 1:2 – 10 баллов, 1:4 – 20 баллов и 1:8 – 30 баллов.

Интенсивность реакции: + – 10 баллов; ++ – 20 баллов и т.д.; + (+) – 15 баллов; ++ (+) – 25 баллов и т.д.

Количество эритроцитов в агрегатах: 3 – 10 баллов; 4 – 20 баллов, 5 – 30 баллов; 4-5 – 25 баллов и т.д.

Процент животных с тем или иным титром ААТ (коэффициент): 1:2 – 1; 1:4 – 1,2; 1:8 – 1,4. Пример: 50% животных с титром ААТ 1:4 = $50 \times 1,2 = 60$ баллов.

Erythromass with a total volume of 1.8 ml was frozen in polyethylene ampoules (Corning Inc., USA) down to -196°C by a rapid immersion of ampoules into liquid nitrogen. Thawing was accomplished on water bath at 42-44°C with a constant shaking of an ampoule up to ice disappearance.

The control of antierythrocyte AABs formation using a direct Coombs' test was performed to the 13th day after introduction of erythrocytes [6].

To receive objective data under quite a big number of indices and possibility to compare a summarized effect of modification of erythrocyte immunogenity we have proposed such an integral parameter as the potential of immunogenity of erythrocytes (PIE), representing the sum of points on each value to be estimated.

PIE calculating: AABs titer: each following dilution is increased by 10 points: 1:2 – 10 points, 1:4 – 20 points and 1:8 – 30 points.

Reaction intensity: + – 10 points; ++ – 20 points, etc; +(+) – 15 points; ++(+) – 25 points, etc.

Number of erythrocytes in aggregates: 3 – 10 points; 4 – 20 points, 5 – 30 points; 4-5 – 25 points

Percentage of animals with this or that AABs titer (coefficient): 1:2 – 1; 1:4 – 1.2; 1:8 – 1.4, etc.

Example: 50% of animals with AABs titer 1:4 = $50 \times 1.2 = 60$ points

Results and discussion

As we have shown and other authors as well [6], intraperitoneal immunization of mice with syngeneic heated up to 49.5°C erythrocytes is accompanied with accumulation of antierythrocyte autoantibodies (AABs) in blood serum. In this case it is important that for each animal AABs titer as well as the number of animals in the group in which AABs are identified may vary. The development of AIHA with this or that manifestation degree of signs which are characteristic for this pathology is appropriate practically in all animals which were injected with modified by temperature treatment erythrocytes.

As the Table data show the introduction to the animals of syngeneic native erythrocytes did not induce the formation of AABs in any animal of this group. Quite a different picture was observed in the 2nd – 4th groups. Thus, after introduction of heated syngeneic erythrocytes (the 2nd group) the AABs were observed in the blood serum of 100% of animals. At the same time there were noted the peculiarities of animal distribution by tested indices. In particular, approximately in 75% of animals of the 1st subgroup the AAB titer was 1:6, in two others, comprising by 13% it was 1:32 and 1:128. A characteristic feature of the AIHA development degree is not only AAB titer, but a number of erythrocytes in the aggregates, formed

Результаты и обсуждение

Как было показано нами и другими авторами [6], внутрибрюшинная иммунизация мышей сингенными эритроцитами, прогретыми до температуры 49,5°C, сопровождается накоплением в сыворотке крови антиэритроцитарных ААТ. При этом важно, что у каждого животного титр ААТ, а также количество животных в группе, у которых идентифицируются ААТ, могут быть различными. Закономерно развитие АИГА с той или иной степенью манифестации признаков, характерных для этой патологии практически у всех животных, которым вводили эритроциты, модифицированные температурной обработкой.

Как видно из приведенных в таблице результатов, введение животным сингенных нативных эритроцитов не индуцировало формирование ААТ ни у одного животного данной группы. Совершенно иная картина отмечена во 2-4-й группах. Так, после введения прогретых сингенных эритроцитов (2-я группа) у 100% животных в сыворотке крови определялись ААТ. При этом были отмечены особенности распределения животных по тестируемому показателю. В частности, примерно у 75% животных 1-й подгруппы титр ААТ был 1:16, в двух других подгруппах, составляющих по 13% – 1:32 и 1:128. Характерным признаком степени

under specific interaction of that or this number of “sitting” on erythrocytes ААBs and interacting with them Coombs’ serum anti-antibodies [6]. As the data obtained testify the erythrocyte number in the 2nd group’s aggregates varied from 4 to 7, moreover where the ААB titer was 1:6 the aggregates consisted of 4-5 erythrocytes and with 1:128 titer it was 6-7 ones.

The results of estimating an organism’s IS response to the introduction of cryopreserved erythrocytes are of interest. Thus, in the 3rd group of animals a positive Coombs’ reaction was registered only in 50% of mice. At the same time the ААB titer was lower in comparison with the 2nd group: approximately in 30% of animals it made 1:2 and in 20% it was 1:8. It testifies to the fact, that the cryopreserved by such a way erythrocytes have less immunogenicity in comparison with those, heated up to 49.5°C. It should be noted that in the 3rd group’s animals with a positive Coomb’s test with 1:2 serum ААB titer there were 3-4 erythrocytes in conglomerates, but with 1:8 titer it made 6-7 erythrocytes.

When considering the results obtained during introduction of erythrocytes, cryopreserved with glycerol (4th group), some differences in comparison with the 3rd group attract our attention. In spite of the fact, that the ААB accumulation was noted approximately in the same number of animals (48.2%), the

Сравнительный анализ образования противозэритроцитарных ААТ у реципиентов после введения сингенных эритроцитов

Comparative analysis of antierythrocyte ААB formation in recipients following infusion of syngeneic erythrocytes

Группы Groups	Вводимые сингенные эритроциты Syngeneic erythrocytes to be introduced	Подгруппы Subgroups	Титр ААТ (разведение сыворотки) ААB titer (serum dilution)	Интенсивность реакции Reaction intensity	Количество эритроцитов в агрегате Erythrocytes number in the aggregate	Процент животных в подгруппе Percentage of animals in the subgroup	ПИЭ PIE
1	Нативные Native	n = 15*	0	–	–	–	–
2	Прогретые до 49,5°C Heated up to 49,5°C	1 2 3 n = 23*	1:16 1:32 1:128	++(+) +(+) ++	4–5 3–4 6–7	73,9 13,0 13,0	475,2
3	Криоконсервированные под защитой ПЭО – 1500 Cryopreserved under PEO – 1500 protection	1 2 3 n = 24*	0 1:2 1:8	+ +(+)	3–4 6–7	50 29,2 20,8	183,3
4	Криоконсервированные под защитой глицерина Cryopreserved under glycerol protection	1 2 3 n = 27*	0 1:4 1:8	– +(+) +	– 4 7	51,8 23,3 25,9	209,2
5	Экспонированные с ПЭО – 1500 Exposed in PEO – 1500 solution	1 2 n = 13*	0 1:2	– +(–)	– 3–4	92,3 7,7	37,7
6	Экспонированные с глицерином Exposed in glycerol solution	1 2 n = 19*	0 1:2	– +(–)	– 3–4	89,5 10,5	50,5

Примечание: * – указано общее количество животных в подгруппе.

Note: * – the total number of animals in a subgroup is mentioned

развития АИГА является не только титр ААТ, но и количество эритроцитов в агрегатах, формируемых при специфическом взаимодействии того или иного количества “сидящих” на эритроцитах ААТ и взаимодействующих с ними антиантител сыворотки Кумбса [6]. Как свидетельствуют полученные нами данные, количество эритроцитов в агрегатах в группе 2 варьировало от 4 до 7, причем там, где титр ААТ был 1:16, агрегаты состояли из 4-5, с титром 1:128 - из 6-7 эритроцитов.

Интересны результаты оценки ответа ИС организма на введение криоконсервированных эритроцитов. Так, в 3-й группе животных положительная реакция Кумбса была зафиксирована только у 50% мышей. При этом титр ААТ был ниже в сравнении со 2-й группой: примерно у 30% животных он составил 1:2 и у 20% животных - 1:8. Данный факт свидетельствует о том, что криоконсервированные по такому методу эритроциты обладают меньшей иммуногенностью в сравнении с эритроцитами, прогретыми до 49,5°C. Надо отметить, что у животных 3-й группы с положительной пробой Кумбса с титром ААТ сыворотки 1:2 эритроцитов в конгломератах было 3-4, а с титром 1:8 составляло 6-7 эритроцитов.

Рассматривая результаты, полученные при введении эритроцитов, криоконсервированных с глицерином (4-я группа), обращают на себя внимание некоторые различия в сравнении с группой 3. Несмотря на то, что накопление ААТ было отмечено примерно у такого же количества животных (48,2%), титр ААТ при индивидуальной оценке у каждого животного был выше и варьировал от 1:4 до 1:8. Характерно, что в 4-й группе процент животных с более высоким титром (1:8) был выше и количество эритроцитов в агломерате также несколько превышало аналогичный показатель в предыдущей группе. Сопоставляя результаты по оценке иммуногенности эритроцитов в группах 2-4 можно также отметить разницу в степени интенсивности реакций агглютинации. Максимальной она была при введении прогретых эритроцитов (на 2-2,5 плюса), менее выраженной при введении эритроцитов, криоконсервированных с глицерином (на 1-2 плюса), и почти в такой же степени (на 1-1,5 плюса) – под защитой ПЭО-1500. Введение эритроцитов, предварительно экспонированных с криопротекторами без замораживания в общем не сопровождалось накоплением ААТ, хотя интересен факт их появления, пусть и при минимальном разведении сыворотки, у незначительного процента животных данных групп.

При оценке интегрального показателя ответа ИС реципиентов на введение сингенных эритроцитов было очевидно, что характер проявления их иммуногенных свойств существенно зависит от

AAB titer at an individual estimation in each animal was higher and varied from 1:4 to 1:8. It is characteristic that in the 4th group the percentage of animals with higher AAB titer (1:8) was bigger and the erythrocyte number in agglomerate also slightly exceeded the similar index in a previous group. When comparing the results on the evaluation of erythrocyte immunogenicity in the 2nd-4th groups we can also note the difference in the intensity degree of agglutination reaction. Maximum it was when introducing the heated erythrocytes (by 2-2.5 “+”), a less manifested during introduction of erythrocytes, cryopreserved with glycerol (by 1-2 “+”), and in quite the same degree (by 1-1.5 “+”) under PEO-1500 protection. The introduction of erythrocytes, preliminarily exposed with cryoprotectants without freezing was not generally accompanied with AAB accumulation, although on interesting was the fact of their appearance, even if the minimum serum dilution in an insignificant percentage of animals of these groups.

When estimating an integral index of the recipients' IS response to the syngeneic erythrocyte introduction it was obvious, that the manifestation character of their immunogenic properties depended in a considerable extent on a “pretreatment” type. Thus, a maximum potential of immunogenicity was observed in heated erythrocytes. This index was lower nearly in 2.3 times in erythrocytes, cryopreserved under glycerol protection and much lower in those, frozen under PEO-1500 protection, i.e. in spite of a considerably lower immunogenicity index, in comparison with the 2nd group, the syngeneic erythrocytes, cryopreserved by two methods used in experimental and applied cryobiology and cryomedicine nevertheless have an immunogenic activity. By other words, after cryopreservation erythrocytes gain a property to induce the response of immune competent cells in the form of the anti-erythrocyte AB production in a syngeneic recipient's organism. Immunogenic properties of any classic antibodies are determined by the presence in their protein structure of sites with the certain amino acid sequence, expanded on these structures surface (an antigen immunogenic epitopes) [3]. Namely to such epitopes under physiological conditions IS produces the non-responsibility: tolerance [5]. The results of the experiments with syngeneic erythrocytes allow to speak about the fact, that after cryopreservation (at least when using the mentioned regimens) there is a change in an epitope spectrum of erythrocyte membrane antigen structures (immunisation centers). Judging on the data obtained such a transformation in the membrane structural organisation has an approximately similar manifestation degree when using both methods, with slightly higher manifestation of signs during erythrocyte cryopreservation with glycerol. However, the fact itself of such “inducible potential” of

того, какую “предобработку” они прошли. Так, максимальный потенциал иммуногенности был отмечен у прогретых эритроцитов. Примерно в 2,3 раза этот показатель был меньше у эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерина и еще ниже у эритроцитов, замороженных под защитой ПЭО-1500, т.е. несмотря на значительно меньший в сравнении с группой 2 показатель иммуногенности криоконсервированные по двум применяемым в экспериментальной и прикладной криобиологии и криомедицине методам сингенные эритроциты все же обладают иммуногенной активностью. Другими словами, после криоконсервирования эритроциты приобретают свойство индуцировать ответ иммунокомпетентных клеток в виде продукции антиэритроцитарных ААТ в организме сингенного реципиента. Иммуногенные свойства любых классических антигенов определяются наличием в их белковой структуре участков с определенной аминокислотной последовательностью, экспансируемых на поверхности этих структур (иммуногенные эпитопы антигена) [3]. В физиологических условиях именно к таким эпитопам ИС вырабатывает неотвечаемость-толерантность [5]. Результаты экспериментов с сингенными эритроцитами позволяют говорить о том, что после криоконсервирования (по крайней мере, при использовании упоминаемых режимов) меняется эпитопный спектр антигенных структур мембраны эритроцитов (центры иммунизации). Судя по полученным данным, такая трансформация структурной организации мембран имеет примерно одинаковую степень выраженности при использовании как одного, так и другого метода с несколько большей манифестацией признаков при криоконсервировании эритроцитов с глицерином. Однако сам факт такого “индуцибельного потенциала” иммуногенности обоих методов криоконсервирования является весьма интригующим. Во-первых, он касается фундаментальных аспектов проблемы криоконсервированных эритроцитов и, во-вторых, затрагивает прикладные ее стороны. Очевидно, что для успешной реализации проблемы создания низкотемпературных банков долгосрочного хранения аутологичной крови необходимо проводить дополнительные исследования по оценке указанных в работе характеристик эритроцитов, не только хранящихся различный период времени, но и криоконсервированных в различных режимах.

Выводы

Приведены результаты сравнительного анализа модификации иммуногенных свойств сингенных эритроцитов, подвергнутых тепловой обработке и криоконсервированию, по их способности индуци-

immunogenicity for both cryopreservation methods seems to be quite intriguing. Firstly, it concerns the fundamental aspects of the problem of erythrocyte cryopreservation and, secondly, is related to its applied sides. It is obvious that for a successful realisation of the task on establishing the low temperature banks for autologous blood long-term storage it is necessary to carry-out the additional investigations on estimating the erythrocyte characteristics, mentioned in the work, not only stored for a different time period, but cryopreserved under various regimens.

Conclusions

There are presented the results of a comparative analysis of the modification in immunogenic properties of syngeneic erythrocytes, subjected to a heat treatment and cryopreservation, by their capability to induce in a recipient's organism the AIHA experimental model. There was established the fact of appearance of immunogenic properties in syngeneic erythrocytes after all types of the mentioned pretreatment. In a comparative aspect it was shown, that a maximally manifested immune response on syngeneic erythrocytes in the form of AABs was observed after their heat treatment under 49.5°C, i.e. the manipulation, which was proposed for the AIHA development induction in the experiments [6]. The erythrocytes, cryopreserved with a 30% glycerol had less manifested immunogenic properties, than the heated ones, however similar to the erythrocytes, cryopreserved with PEO-1500, they induced the autoimmune reaction development approximately in 50% of mice-recipients. This fact testifies to the modification of erythrocyte antigen spectrum under the effect of cryopreservation factors, that is the consequence of the realisation of freeze-thawing effect itself, because the effect of cryoprotectants “as they are” on this process is minimum.

References

1. *Agranenko V.A., Fedorova L.I.* Frozen blood and its clinical application.– Moscow: Meditsina, 1983.– 96 p.
2. *Babichuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO-1500 // *Problems of Cryobiology.*– 2001.– N1.– P. 35-37.
3. *Goltsev A.N.* Probable causes of the development of autoimmune pathology and search for the ways of its treatment // *Suchasni Problemy Meditsiny ta Osvity.* – 1999.– N1.– P. 46-52.
4. *Morschakova E.F., Pavlov A.D., Rumyantsev A.G.* Anemia under malignant neoplasms: pathogenesis and correction ways // *Gematol. Transfusiol.*– 1999.– Vol.44, N6.– P. 61-62.
5. *Trufakin V.A., Lozovoy L.P.* Effect of somatotropic hormones on autoimmune reactions, induced in mice of various genotypes with syngeneic heated erythrocytes // *Bull. Experimen. Biology.*– 1977.– N3.– P. 305-308.
6. *Efuni S.S.* Etiology and pathogenesis of autoimmune diseases // *Gematol. Transfusiol.*– 1993.– N4.– P. 32-37.

ровать в организме реципиентов экспериментальную модель АИГА. Установлен факт появления иммуногенных свойств у сингенных эритроцитов после всех видов указанной предобработки. В сравнительном аспекте показано, что максимально выраженный иммунный ответ на сингенные эритроциты в виде продукции ААТ наблюдается после их тепловой обработки при 49,5°C, т.е. той манипуляции, которая была предложена для индукции развития АИГА в экспериментальных исследованиях [6]. Эритроциты, криоконсервированные с 30%-м глицерином, обладали менее выраженными иммуногенными свойствами, чем прогретые, однако подобно эритроцитам, криоконсервированным с ПЭО-1500, они индуцировали развитие аутоиммунной реакции примерно у 50% мышей – реципиентов. Данный факт свидетельствует о модификации антигенного спектра эритроцитов под действием факторов криоконсервирования, что является следствием реализации собственно эффекта замораживания-отогрева, поскольку влияние на этот процесс криопротекторов “в чистом виде” минимально.

Литература

1. *Аграненко В.А., Федорова Л.И.* Замороженная кровь и ее клиническое применение.– М.: Медицина, 1983.– 96 с.
2. *Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г.* Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 35-37.
3. *Гольцев А.Н.* Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Сучасні проблеми медицини та освіти.– 1999.– №1.– С. 46-52.
4. *Морщакова Е.Ф., Павлов А.Д., Румянцев А.Г.* Анемии при злокачественных новообразованиях: Патогенез и способы коррекции // Гематол. и трансфузиол.– 1999.– Т. 44, №6.– С. 61-62.
5. *Труфакин В.А., Лозовой Л.П.* Влияние соматотропного гормона на аутоиммунные реакции, индуцированные у мышей разных генотипов сингенными прогретыми эритроцитами // Бюл. эксперим. биологии.– 1977.– №3.– С. 305-308.
6. *Эфуни С.С.* Этиология и патогенез аутоиммунных заболеваний // Гематол. и трансфузиол.–1993.–№4.– С. 32-37.
7. *Barker R.N., De Sa Oliveira G.G.* Pathogenic autoantibodies in the NZB mouse are specific for erythrocyte band 3 protein // Eur. J. Immunol.– 1993.– Vol. 23.– P. 1723-1726.
8. *Khan S.H., Emerit I.* Superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages of New Zealand black mice // Free. Radic. Biol. Med.– 1990.– Vol.8, N4.– P. 339-345.
9. *Scott B.B., Sadigh S.* Molecular mechanisms resulting in pathogenic anti-mouse erythrocyte antibodies in New Zealand black mice // Clin. Exp. Immunol.– 1993.– Vol.93.– P. 26-33.

Accepted in 27.02.2004

Поступила 27.02.2004.