

Криоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина (n=25)

А.М. КОМПАНИЕЦ, А.В. НИКОЛЕНКО, В.В. ЧЕКАНОВА, Ю.П. ТРОЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Одним из путей дальнейшего совершенствования низкотемпературного консервирования биологических объектов является создание новых и, более эффективных криопротекторов в ИПКиК НАН Украины. С этой целью используется оригинальный подход, заключающийся в структурной модификации молекул известных криопротекторов. Так, оксиэтилирование – введение в молекулы криопротекторов этоксигрупп (OCH_2CH_2)_n позволило направленно изменять их физико-химические и биологические свойства, механизм криозащиты: полученные соединения теряли способность проникать в клетки и, в отличие от исходного вещества, приобретали характер криопротекторов экзоцеллюлярного действия [7, 9]. В отделе криопротекторов института были синтезированы полимергомологи оксиэтилированного глицерина разной степени полимеризации (n), исследованы их физико-химические свойства, токсичность, а также проведены исследования по изучению криопротекторных свойств олигомеров ОЭГ со степенью полимеризации 1-40 при замораживании эритроцитов, тромбоцитов и других биологических объектов [4, 5, 6]. В частности, было установлено, что ОЭГ со степенью полимеризации n=20-30 обладают криозащитным действием при замораживании эритроцитов человека [6]. Однако исследования в этом направлении не получили дальнейшего развития, хотя поиск веществ, не требующих удаления из клеточной взвеси перед трансфузией, по-прежнему является одним из актуальных направлений современной криобиологии и трансфузиологии.

Цель работы – изучение криозащитной эффективности олигомера оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации n=25 при замораживании эритроцитов человека.

Задача исследования – изучение действия различных концентраций веществ, скорости и температуры ввода криозащитных сред, длительности экспозиции, режимов замораживания и отогрева на сохранность эритроцитов человека.

Материалы и методы

Оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации n=25 был получен в Ивано-

Адрес для корреспонденции: Компаниец А.М., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Франковске на фирме “Барва”. Синтез проводили в атмосфере паров азота при соотношениях спирта и окиси этилена 1:25, 1:30, температуре 15° С, давлении 4-5 атм., а также в присутствии щелочного катализатора КОН (количество составило 0,2% от общего веса реагентов). В результате проведенного синтеза получены образцы, которые нейтрализовали в чистом виде катионообменную смолой КУ-2-8°С до значения рН 6,8 (измерялся рН 5% водного раствора веществ).

Нейтрализованные образцы ОЭГ n=25 осветляли путем перемешивания со свежеприготовленным нейтральным активированным углем марки “А” и последующей фильтрацией смеси на друк-фильтре. В результате был получен обесцвеченный образец вещества – оксиэтилированный глицерин.

Результаты определения их основных физико-химических свойств представлены в табл. 1.

Объектом исследования являлись эритроциты, полученные из донорской крови человека, заготовленной на гемоконсерванте “Глюцидир” и хранившейся после эксфузии не более 2-х суток при 4°С.

Исследуемые растворы ОЭГ, приготовленные на 0,9%-ном растворе NaCl при концентрациях 30 и 40%, соединяли с эритроцитами и замораживали в металлических контейнерах вместимостью 2 мл в жидком азоте и с использованием шуги азота. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40 и 50° С в течение 40 и 20 с.

Степень сохранности эритроцитов после замораживания-оттаивания оценивали по следующим показателям: гематокрит (общий объем клеток, %) определяли в капиллярах на микроцентрифуге МГЦ-8; осмотическая хрупкость в 0,6 и 0,9%-ных растворах NaCl [8]; процент гемолиза определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм и рассчитывали относительно 100% гемолиза, морфологию эритроцитов исследовали методом световой микроскопии.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода Стьюдента.

Результаты исследований

На первом этапе исследований была изучена токсичность растворов ОЭГ n=25 для эритроцитов человека на этапе эквilibрации. Анализ полученных результатов показал, что после 30-минут-

ной экспозиции эритроцитов с испытуемыми веществами в диапазоне концентраций 20-40% их осмотическая устойчивость (показатели осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl), процент гемолиза находились на уровне контроля, т.е. показателей для интактных эритроцитов. Изучение эритроцитов в световом микроскопе выявило преобладание дискоидных форм и полное отсутствие агломератов, появляющихся после воздействия некоторых других полимерных соединений (например, ПЭО-1500).

Далее детально изучено влияние различных факторов низкотемпературного консервирования эритроцитов с ОЭГ $n=25$, включая влияние начальной концентрации вещества в криозащитном растворе и конечной – в суспензии эритроцитов, а также скорости и температуры ввода, времени экспозиции на показатели сохранности эритроцитов после замораживания-оттаивания.

С использованием факторного эксперимента исследовалось влияние начальных концентраций ОЭГ $n=25$ (30 и 40%), которые вводились в суспензию эритроцитов до достижения конечной концентрации 10, 15 и 20% (табл. 2). Анализ полученных данных показал, что наиболее высокие показатели сохранности клеток после отогрева были получены для эритроцитов, замороженных под защитой 15 и 20%-ных конечных концентраций ОЭГ, которые достигались введением 30%-ной криозащитной среды (табл. 3). При использовании криозащитных растворов, содержащих 40%-ную начальную концентрацию ОЭГ, получены следующие результаты: сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева с 15%-ной конечной концентрацией была такой же, как и при исполь-

Таблица 1. Физико-химические свойства 10%-го раствора глицерина и его оксиэтилированной производной

Вещество	Плотность, г/см ³	Вязкость, Па·с	σ , ерг/см ²	Температура заморозания, °С	Коэффициент распределения
Глицерин	1,02350	$1,235 \times 10^{-2}$	71,790	- 2,15	0
ОЭГ $n=25$	1,01426	$1,522 \times 10^{-2}$	67,307	- 0,15	1,01

Таблица 2. План эксперимента по влиянию начальной и конечной концентраций ОЭГ $n=25$.

Начальная концентрация, %	Конечная концентрация, %	Количество защитной среды на 10 мл эритроцитарной массы	Время ввода, мин	Температура ввода, °С
30	10	5,0	4'50"	18
30	15	10,0	4'45"	18
30	20	20,0	5'0"	18
30	10	3,3	4'50"	18
30	15	6,0	4'40"	18
30	20	10,0	4'45"	18

Влияние начальной и конечной концентрации ОЭГ $n=25$ на сохранность криоконсервированных эритроцитов, $M+\delta$, $n=7$.

С% начальная	С% конечная	Осмотическая хрупкость в 0,6% NaCl	Осмотическая хрупкость в 0,9% NaCl	Гемолиз, %	Гематокрит, %	Условия хранения
30	15	$11,05 \pm 2,95^{**}$	$7,75 \pm 0,35^*$	$0,95 \pm 0,05^*$	$23,6 \pm 0,9$	Азот
30	10	$25,5 \pm 3,2$	$22,5 \pm 0,5$	$2,45 \pm 0,05$	$21,8 \pm 0,4$	Азот
30	20	$20,5 \pm 1,5$	$7,75 \pm 0,05^*$	$1,05 \pm 0,1^{**}$	$20,7 \pm 0,5$	Азот
40	10	$26,5 \pm 3,5$	$23,5 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,6$	$21,3 \pm 0,47$	Азот
40	15	$12 \pm 3^{**}$	$7,7 \pm 0,8^*$	$1,25 \pm 0,5^{**}$	$23,9 \pm 0,6$	Азот
40	20	$42,5 \pm 4,5$	34 ± 1	$2,3 \pm 0,1$	$23,5 \pm 0,5$	Азот

Примечание: * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с 10% и 20%-ми концентрациями.

зовании меньшей, (30%-й) начальной концентрации ОЭГ, однако с увеличением содержания криопротектора в суспензии эритроцитов до 20% показатели их сохранности (осмотическая хрупкость, гемолиз) значительно ухудшались. Полученные результаты, по-видимому, отражают воздействие различной осмотической нагрузки на клетки. Замораживание эритроцитов с 10%-ной

конечной концентрацией ОЭГ n=25 независимо от начальных концентраций вещества приводит к достоверному повышению как осмотической хрупкости, так и величины гемолиза, что свидетельствует о более низком криозащитном действии данной концентрации (табл. 3).

Изучение влияния скорости ввода криопротектора (0,18, 0,36 и 1,8 мл/млхмин), температуры ввода (0°C, 18°C и 36°C) и длительности экспозиции (5, 15 и 30 мин) на показатели сохранности эритроцитов после замораживания осуществляли с 30% растворами ОЭГ (15% конечная концентрация) (табл. 4).

Результаты проведенных исследований показали, что скорость ввода криозащитных сред, содержащих оксиэтилированный глицерин, является значимым фактором для результатов криоконсервирования эритроцитов. Данные, представленные в таблице 4, свидетельствуют, что при использовании ОЭГ в качестве криопротектора целесообразно применять медленные скорости ввода криозащитных растворов (менее 0,4 мл/мл х мин), что способствует повышению показателей сохранности эритроцитов после замораживания.

Что касается влияния фактора температуры ввода криозащитной среды, то более высокий уровень сохранности эритроцитов по показателям осмотической хрупкости был получен при использовании как 0°C, так и 36°C в сравнении с комнатной температурой (18°C), тогда как на показатели гематокрита и величину гемолиза фактор температуры ввода не оказывал влияния (табл. 4). Исследование длительности экспозиции

эритроцитов с ОЭГ n=25 в интервале 5, 15, 30 мин при комнатной температуре на показатели сохранности криоконсервированных эритроцитов свидетельствует об отсутствии влияния этого фактора на показатели осмотической хрупкости и гематокрита. Отмечается тенденция к снижению уровня гемолиза эритроцитов после замораживания-оттаивания при условии увеличения времени экспозиции эритроцитов с криопротектором до 30 мин (табл. 4).

Для успешного криоконсервирования биологических объектов, в том числе эритроцитов, важное значение имеют скорости замораживания. Литературные данные свидетельствуют об использовании разных режимов замораживания эритроцитов. Чаще всего эритроциты замораживают простым погружением в жидкий азот [3,7]. Хорошие результаты были получены при "распылении" эритроцитов в жидком азоте без криопротектора [7]. Для замораживания эритроцитов с "Пропандио-сахаролем" (метод А.М.Воротилина) был разработан специальный двухэтапный режим их охлаждения, а также двухэтапный режим отогрева [2].

Мы исследовали различные двухэтапные режимы замораживания-отогрева эритроцитов с непроницающими криопротекторами и получили неудовлетворительные результаты, свидетельствующие о бесперспективности данного подхода применительно к оксиэтилированным глицеринам; более удачным оказалось использование высоких скоростей замораживания. Положительные результаты по сохранности криоконсервированных

Таблица 4. Показатели сохранности эритроцитов после низкотемпературного консервирования с 30% раствором ОЭГ.

Условия ввода криозащитной среды		Осмотическая хрупкость 0,6 % NaCl,%			Осмотическая хрупкость 0,9% NaCl			Гемолиз, %			Гематокрит, %		
		x	δ	s	x	δ	s	x	δ	s	x	δ	s
Скорость ввода мл/мл.мин	1,8	28,5	1,4	1,74	25,6	0,47	0,57	5,76	0,49	0,6	16,3	0,47	0,57
	0,36	8,5*	2,46	3,01	8,86*	2,95	3,58	2,13*	0,24	0,3	22,3*	1,24	1,52
	0,18	9,37*	2,63	3,03	6,72*	0,29	0,34	2,25*	0,25	0,35	22,5*	1,41	1,73
Температура ввода, °С	0	6,7	0,16	0,2	6,4	0,08	0,1	2,23	0,09	0,11	22,3	0,47	0,57
	18	8,56	2,44	2,98	8,53	2,46	3,08	2,57	0,34	0,42	23,3	0,94	1,15
	36	6,6	0,32	0,4	6,6	0,1	0,1	2,36	0,18	0,23	21,3	0,47	0,57
Время экспозиции эритроцитов, мин	5'	6,7	0,16	0,2	6,4	0,08	0,1	2,23	0,09	0,11	22,3	0,47	0,57
	15	6,85	0,25	0,35	6,5	0,1	0,1	1,95	0,15	0,21	21,5	0,5	0,7
	30	6,85	0,25	0,35	6,3	0,3	0,42	1,6	0,1	0,14	22,5	0,5	0,7

Примечание: * – p<0,001, различия достоверны по сравнению со скоростью ввода 1,8 мл/млхмин.

эритроцитов были получены при увеличении скорости замораживания с использованием шуги азота.

Известно, что существует зависимость сохранности деконсервированных эритроцитов разных доноров от их начальной криоустойчивости к процессу замораживания-оттаивания. На этот показатель влияет много факторов, одним из которых является объем замораживаемых клеток (показатель гематокрита). Мы получили зависимость сохранности осмотической устойчивости клеток от объема замороженной эритроцитной массы. Чем выше показатель гематокрита, тем выше показатель осмотической хрупкости размороженных эритроцитов. Использование высоких скоростей замораживания (использование шуги) приводит к достоверному снижению показателей осмотической хрупкости в 0,6% и 0,9%-х растворах NaCl как в обычной взвеси размороженных эритроцитов (гематокрит 25-30%), так и в эритроконцентрате (гематокрит 35-40%).

Результаты исследования эффективности двух режимов замораживания и отогрева эритроцитов под защитой 30%-го раствора ОЭГ n=25 представлены на рис. 1 и 2. Анализ полученных данных свидетельствует о преимуществе использования более высоких скоростей замораживания эритроцитов. Лучшие результаты получены при замораживании эритроцитов в шуге азота и отогреве на водяной бане при 50°C.

Таким образом, проведенные исследования позволили определить факторы, влияющие на сохранность эритроцитов человека при их низкотемпературном консервировании под защитой оксиэтилированного глицерина – ОЭГ n=25, которые необходимо учитывать при разработке метода криоконсервирования эритроцитов человека с данным веществом.

Выводы

Установлена перспективность использования олигомера ОЭГ n=25 в качестве криопротектора для криоконсервирования эритроцитов человека.

Определены факторы, влияющие на сохранность эритроцитов человека при их низкотемпературном консервировании под защитой ОЭГ n=25: начальная и конечная концентрация криопротектора в суспензии эритроцитов, скорость и температура ввода криозащитной среды, время экспозиции и режимы замораживания-оттаивания.

Показано, что для более высокой сохранности эритроцитов целесообразно использовать 30%-ную концентрацию криопротектора, медленную скорость ввода криозащитной среды в суспензию эритроцитов (не более 0,4мл/мл×мин) при темпе-

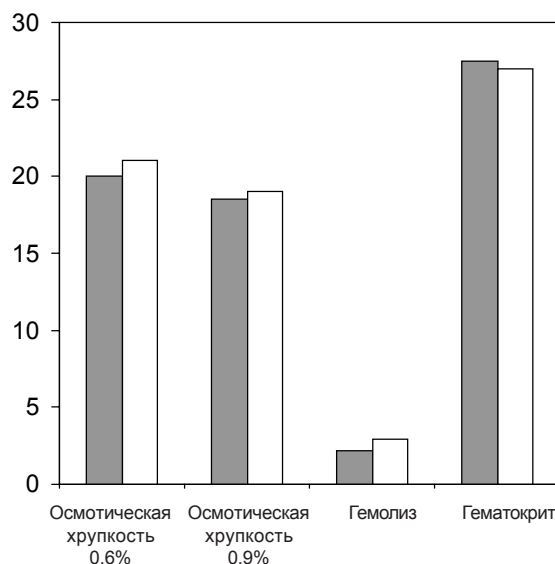


Рис. 1. Показатели сохранности эритроцитов, замороженных погружением в жидкий азот под защитой 30%-го раствора ОЭГ n=25 и отогреве при: ■ – 40°C; □ – 50°C.

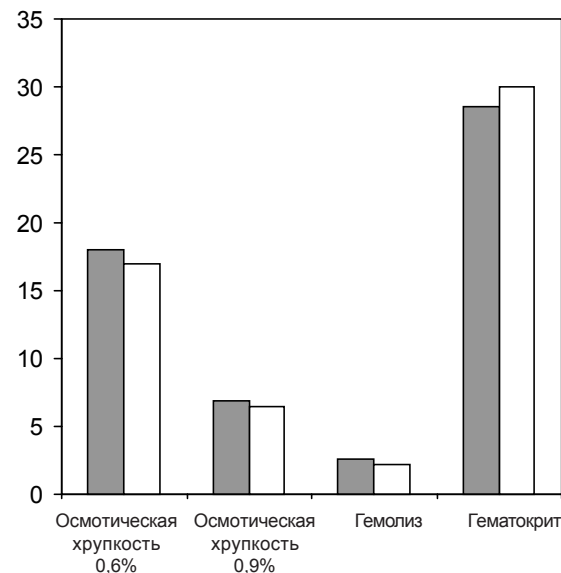


Рис. 2. Показатели сохранности эритроцитов, замороженных в шуге азота под защитой 30%-го раствора ОЭГ n=25 и отогреве при: ■ – 40°C; □ – 50°C.

ратуре 0 или 36°C, длительность экспозиции 30 мин с последующим замораживанием в шуге азота.

Литература

1. Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова И., Семенова Н.В. и др. Усовершенствование криоконсервирования эритроцитов при ультранизких температурах // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1980. – №9. – С. 19-23.
2. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Харьков, 1987. – С. 32.

3. *Лаврик С.Е., Полубояринова А.Г., Кушко О.В. и др.* Консервирование эритроцитов глибоким замораживанием при применении низкомолекулярного поливинилпирролидона // Проблемы гематологии и переливания крови.– 1973.– №9.– С. 15-19.
4. *Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И.* Криопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов // Криобиология и криомедицина.– 1981.– Вып. 8.– С. 34-40.
5. *Луговой В.И., Коцкий С.В., Компаниец А.М., Николенко А.В.* Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина // Пробл. криобиологии.– 1999.– №3.– С. 46-53.
6. *Матвиец Н.М.* Оксигилирование глицерина – метод создания криозащитных веществ / В кн.: Современные проблемы криобиологии.– Киев: Наук. думка, 1976.– С.15-19.
7. *Пушкарь Н.С., Белоус А.М.* Введение в криобиологию.– Киев: Наукова думка, 1975. – 334 с.
8. *Тодоров Й.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии.– София: Медицина и физкультура.– 1961.– 783 с.
9. *Шраго М.И., Калугин Ю.В., Кочуровская Г.Г. и др.* Влияние оксигилирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина // Криобиология и криомедицина.– 1976.– Вып. 2.– С. 31-33.