

Криоконсервирование и сохранность эритроцитов животных

Г.Ф. ЖЕГУНОВ,¹ О.Н. ДЕНИСОВА¹, Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ²

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Переливание крови издавна считается высокоэффективным методом интенсивной терапии. Наиболее частым показанием для трансфузии является острая или хроническая кровопотеря, а также анемии различного генеза. В ветеринарной практике часто возникают ситуации, когда необходимо быстро восполнить кровопотерю животного, а подходящего донора в этот момент нет. Ветеринарные врачи иногда из-за недостатка донорской крови не могут оказать помощь животному, и оно гибнет на операционном столе. Консервированная цельная кровь с добавлением раствора ADSOL хранится при температуре 4°C около 42 дней. Однако при таком хранении изменяется функциональность эритроцитов на протяжении 28 дней, трансфузия таких клеток носит повреждающий характер при клиническом применении [5, 12]. Поэтому создание запасов донорской крови животных возможно лишь при долгосрочном хранении клеток в замороженном состоянии.

Целью данной работы было разработать методы криоконсервирования, определить сохранность и функциональные показатели эритроцитов лошади, быка, собаки после цикла замораживания-отогрева под защитой диметилсульфооксида (ДМСО) и полиэтиленгликоля м.м. 1500 (ПЭГ-1500).

Материалы и методы

Эритроциты лошади, быка, собаки замораживали с 30% глицерином, 20% ДМСО и 30% ПЭО-1500. Криоконсерванты добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1. Отогрев после низкотемпературного хранения производили в водяной бане 42-45°C. Проникающий криопротектор удаляли серийным центрифугированием. На первом этапе к взвеси оттаянных эритроцитов добавляли равный объем гипертонического солевого раствора, содержащего 0,6 М NaCl, pH 7,4. После чего эритроциты дважды промывали изотоническим раствором NaCl, pH 7,4. Моделирование трансфузии осуществляли путем переноса суспензии эритроцитов в среду с физиологической тоничностью при 37°C. Разведение эритроцитов изотоническим раствором составляло 1:10. Индекс осмотической хрупкости определяли как концент-

рацию NaCl, при которой происходит 50%-й гемолиз. После цикла замораживания-оттаивания определяли концентрацию 2,3-ДФГ по методу [4] и АТФ по методу [6]. Эритроциты жвачных характеризуются низким содержанием 2,3-ДФГ, что биохимически обусловлено укорочением N-терминального конца I-цепи гемоглобина, где в других видах эритроцитов находится сайт для связывания 2,3-ДФГ [7]. Поэтому определение данного метаболита в эритроцитах быка не проводилось. Тени эритроцитов получали гипотоническим шоком по методу [8], лизируя клетки на ледяной бане в 5 мМ фосфатном буфере, pH 8,0. Белки разделяли в ПААГ с градиентом пористости геля 5-20T4C.

Статистическую обработку данных проводили согласно программе "Stat Graphics Plus". Количество экспериментов в каждой серии опытов было пять и более.

Результаты и обсуждение

Для всех исследованных групп клеток минимальный уровень гемолиза после размораживания отмечался для ПЭО-1500 (1-3%), а максимальный – для глицерина (рис. 1). После криоконсервирования клеток с ДМСО уровень гемолиза в надсадке колеблется от 18% (у человека) до 28% (у лошади). При этом менее всего повреждаются эритроциты человека и собаки, а больше всего – эритроциты лошади. На основании первичной оценки сохранности клеток в процессе криоконсервирования был сделан вывод, что глицерин не способен обеспечить приемлемый уровень защиты эритроцитов животных при низких температурах. Возможно, это связано с тем, что данный криопротектор слабо или вообще не проникает через мембрану эритроцитов лошади, быка и собаки. ДМСО лучше, чем глицерин проникает в большинство биологических объектов [3] и позволяет сохранить достаточно высокий процент выживаемости эритроцитов данных животных после замораживания-отогрева. Поэтому для более детального анализа функциональных параметров клеток в дальнейшем сравнивали эффективность ПЭО-1500 и ДМСО. Стабильность суспензии эритроцитов была тестирована по индексу осмотической хрупкости, который свидетельствует об изменении механо-

Адрес для корреспонденции: Жегунов Г.Ф., Харьковская государственная зооветеринарная академия, пгт. Малая Даниловка, Харьковская обл., Украина 62341

эластических свойств плазматической мембраны. Индекс осмотической хрупкости (рис. 2) для эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО, достоверно выше в сравнении как с контрольными клетками, так и с эритроцитами, замороженными под защитой ДМСО. При сравнении данного показателя в группе контрольных и криоконсервированных с ДМСО клеток не обнаружено достоверно значимых отличий. При сравнении индекса осмотической хрупкости эритроцитов исследуемых животных видно, что эритроциты лошади являются менее осмотически устойчивыми, в то время как эритроциты собаки наиболее осмотически устойчивыми. Аналогичные закономерности были отмечены и при оценивании уровня гемолиза после размораживания клеток. Видовая специфика устойчивости эритроцитов к стрессовым воздействиям, очевидно, связана со структурными особенностями мембранно-цитоскелетного комплекса. Сравнительное изучение белков мембран эритроцитов с помощью электрофореза показало, что основные полосы 1, 2, 3 и 5 присутствуют в эритроцитах всех исследуемых нами животных. Белки полосы 4.1 и 4.2 присутствуют в белковом спектре у быка, собаки и человека. Однако в эритроцитах лошади обнаружен дефицит белка полосы 4.2, который является важным компонентом, определяющим осмотическое поведение (устойчивость) клеток [10].

Перенос клеток в условия с физиологической тоничностью при 37°C дает предварительное представление о степени сохранности эритроцитов в кровеносном русле. Из проведенных экспериментов (рис. 3) видно, что перенос эритроцитов во всех группах животных в изотонические условия после замораживания под защитой ДМСО не показал достоверно значимых отличий от контроля на протяжении суток. Перенос эритроцитов лошади, быка, собаки после их криоконсервирования под защитой ПЭО-1500 в изотонический раствор NaCl при 37°C ведет к резкому возрастанию гемолиза, что отражает глубину повреждений клеток. Эти отличия для эритроцитов животных, криоконсервированных с ПЭО-1500 от контроля (и клеток, замороженных в присутствии ДМСО) видны уже в течение первого часа. По истечении суток в данной серии экспериментов гемолиз увеличивается с 32–36 до 50%.

Восстановление полноценности эритроцитов после низкотемпературного хранения предполагает оптимизацию как энергетического потенциала и жизнеспособности (показателем которых является АТФ), так и функциональных свойств (коррелирующих с 2,3-ДФГ) [1]. Концентрация АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах лошади, быка, собаки при

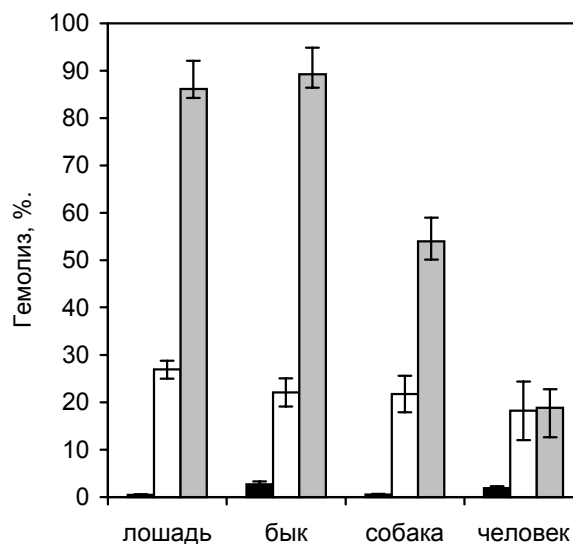


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих после замораживания-отогрева под защитой криопротекторов: ■ – ПЭО; □ – ДМСО; ▒ – глицерин.

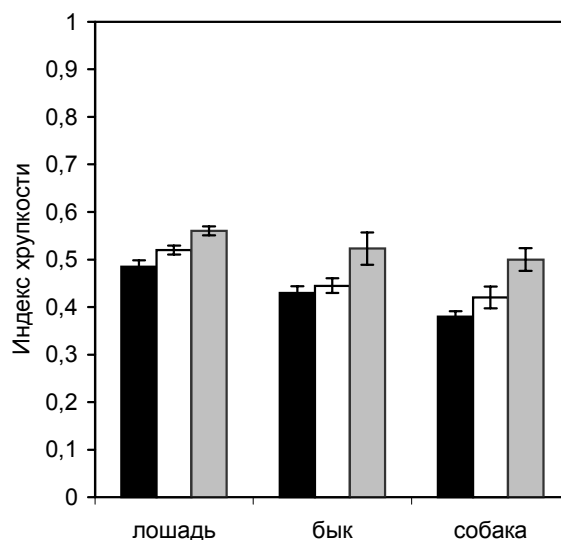


Рис. 2. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов млекопитающих в растворах криопротектора: ■ – контроль; □ – ДМСО; ▒ – ПЭО.

добавлении криопротекторов и последующем цикле замораживания – оттаивания достоверно не отличается от концентрации данных метаболитов в контрольной группе. Для выявления нарушений метаболизма эритроцитов использовали модель трансфузии. Так как инкубационная среда не содержала энергетических субстратов, то с течением времени происходит истощение энергетического потенциала. Однако этот методический подход позволит оценить в функциональном аспекте метаболическую стабильность клеток, криоконсервированных с различными криопротекторами. Использование модели трансфузии показало, что после криоконсервирования эритроцитов животных под защитой ПЭО-1500 уровень АТФ (рис. 4) и 2,3-ДФГ (рис. 5) в клетках падает.

Величина данных метаболитов в эритроцитах исследуемых животных, криоконсервированных под защитой ДМСО, достоверно не отличается от контрольной группы.

Сохранение высоких уровней АТФ и 2,3-ДФГ в клетках после низкотемпературной консервации под защитой ДМСО свидетельствует о том, что клетки после цикла замораживания-отогрева обеспечивают поддержание метаболизма на приемлемом уровне. Оптимальная концентрация АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах связана с эффективностью трансфузии. Жизнеспособность эритроцитов после трансфузии зависит от концентрации АТФ, хотя уровень этого метаболита не может быть лимитирующим фактором определения их посттрансфузионной выживаемости. Функция транспорта кислорода гемоглобином связана с уровнем 2,3-ДФГ. В случае истощения уровня АТФ в клетке 2,3-ДФГ является резервным источником этого макроэргического соединения [9]. Исследования [11] показывают, что АТФ является инициатором гликолиза в эритроцитах и его лимитирующим фактором, а также источником энергии для Na^+ , K^+ -АТФазы, Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы.

Принято считать, что биологические мембраны являются наиболее криочувствительным компонентом клеток [2]. Результаты электрофоретического анализа свидетельствуют о том, что белковый спектр мембраны эритроцитов животных после обработки криопротекторами и последующего их криоконсервирования качественно не меняется (не происходит выпадения или образования новых полос). Отсутствие выраженных изменений в организации мембранных белков при действии низких температур может быть связано с их криостабильностью или недостатком применяемой методики для выявления возможных изменений.

Выводы

Установлено, что ПЭО-1500 способен воздействовать на клетки как положительно, выступая в роли протектора и защищая их от разрушений в условиях криоконсервирования, обеспечивая

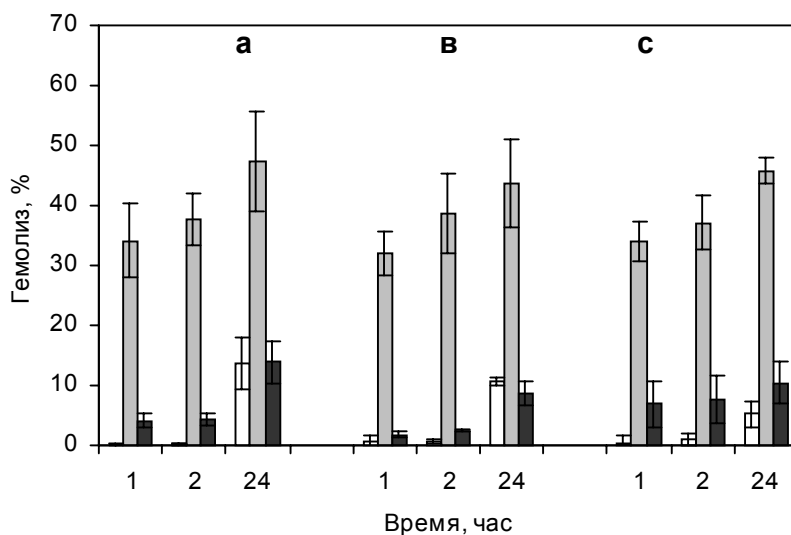


Рис. 3. Уровень гемолиза эритроцитов собаки (а), лошади (в), быка (с) после моделирования трансфузии: □ – контроль; ▒ – после криоконсервирования под защитой 30%-го раствора ПЭО; ■ – после криоконсервирования под защитой 20%-го раствора ДМСО.

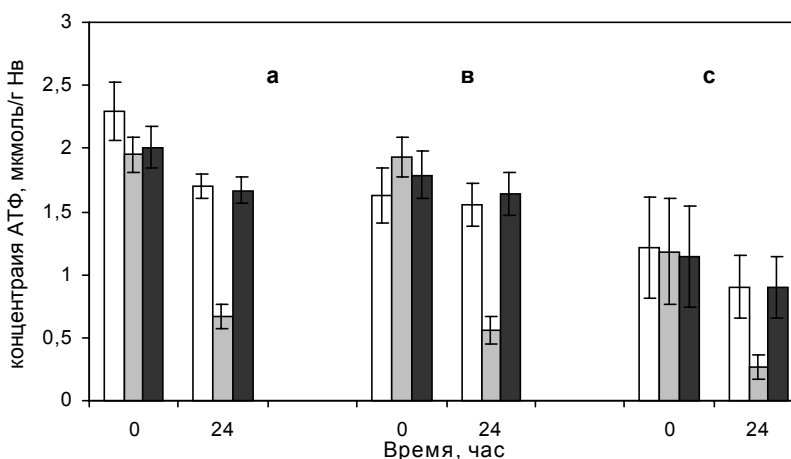


Рис. 4. Динамика изменений уровня АТФ в эритроцитах собаки (а), лошади (в), быка (с) после криоконсервирования (n=6): □ – контроль; ▒ – под защитой 30%-го раствора ПЭО; ■ – под защитой 20%-го раствора ДМСО.

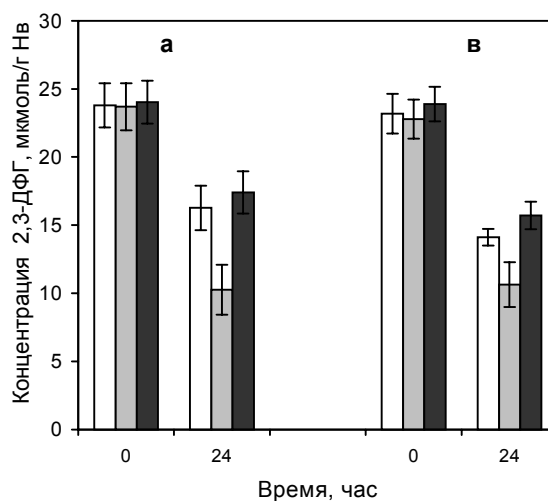


Рис. 5. Динамика изменений уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах собаки (а), лошади (в) после криоконсервирования (n=6): □ – контроль; ▒ – под защитой 30%-го раствора ПЭО; ■ – под защитой 20%-го раствора ДМСО.

высокий уровень выживаемости после размораживания, так и отрицательно, вызывая дестабилизацию мембран, что проявляется в физиологических условиях. Наиболее эффективным (по совокупности исследуемых параметров) для эритроцитов лошади, быка, собаки оказался ДМСО, который обеспечивает приемлемый уровень сохранности клеток после замораживания-отогрева и последующую стабильность клеток.

Литература

1. *Аграненко В.А., Федорова Л.И.* Замороженная кровь и ее клиническое применение.– М.: Медицина, 1983.– 96 с.
2. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
3. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 432 с.
4. *Мешкова Н.П., Алекахина В.В.* Определение фосфоглицериновой кислоты // Успехи биологической химии.– 1954.– С. 285-288.
5. *Мокеев И. Н.* Инфузионно-трансфузионная терапия: Справочник.– М., 1998.– 232 с.
6. *Beutler E.* Red cell metabolism. A manual of biochemical methods.– New York: Crune and stration.– 1975.– 160 p.
7. *Bunn H.F.* Evolution of mammalian hemoglobin function // Blood.– 1981.– Vol. 58, N2.– P. 189-197.
8. *Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H.* Electrolitic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane // Biochemistry.– 1971.– Vol. 10.– P. 2606-2617.
9. *Juel R.* 2-3-diphosphoglycerate: its role in health and disease // CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.– 1979.– Vol. 10, N2.– P. 113-146.
10. *Matei H., Frentescu L., Benga Gh.* Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J. Cell. Mol. Med.– 2000.– Vol. 4.– N4.– P. 270-276.
11. *Schrier S.H.* Human erythrocytes membrane enzymes: current status and clinical correlates // Blood.– 1977.– Vol. 50, N2.– P. 227-237.
12. *Walker R.H.* Technical Manual "American Association of Blood Banks".– Bethesda.– 1996.– 200 p.