

Влияние криоконсервирования с криопротектором ПЭО-1500 на структурно-функциональные показатели эритроцитов кордовой крови

О.Л. ТИМЧЕНКО, В.В. РЯЗАНЦЕВ, Л.А. БАБИЙЧУК, П.М. ЗУБОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Существует необходимость создания запасов эритроцитов донорской и, особенно, обогащенной биологически активными веществами кордовой крови для использования в клинической практике. Поэтому разработка методов криоконсервирования как способа долгосрочного хранения эритроцитов кордовой крови является актуальной проблемой.

В настоящее время существует метод криоконсервирования эритроцитов донорской крови под защитой непроницающего криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500, который позволяет достаточно эффективно защищать эритроциты в процессе замораживания-отогрева и не требует удаления после размораживания клеток. При этом максимально выраженный положительный защитный эффект наблюдается при дозированном добавлении данного криопротектора в суспензию эритроцитов при низкой положительной температуре. [1]

Исходя из того, что эритроциты кордовой крови имеют целый ряд структурно-функциональных особенностей, отличающих их от эритроцитов взрослого человека, целью работы являлось изучение структурно-функциональных показателей эритроцитов КК до и после криоконсервирования с ПЭО-1500 с использованием «холодовой» обработки клеток.

Объектом исследования служили эритроциты кордовой и донорской крови человека. Эритроциты подвергались трехкратной отмывке от плазмы и лейкоцитов в физиологическом растворе. Добавление криопротектора к суспензии клеток производилось дозированно при низкой положительной температуре 1:1 по объему. Оттаивание производили при 42-44°C в водяной бане.

Для оценки сохранности эритроцитов донорской и кордовой крови и структурно-функциональной полноценности после криоконсервирования определяли гемолиз, содержание АТФ[2], 2,3-ДФГ[3], общего белка, соотношение фракций мембранных белков[4].

Полученные данные по гемолизу эритроцитов как после размораживания, так и после модели-

рования трансфузии наглядно демонстрируют достаточно высокую сохранность эритроцитов после криоконсервирования с ПЭО-1500 (таблица). При этом видно, что «холодовая» обработка эритроцитов кордовой крови способствует повышению их устойчивости к последующему замораживанию-отогреву, о чем свидетельствует более низкий уровень гемолиза сразу после отогрева суспензии и особенно это проявляется в уменьшении осмотической хрупкости после переноса в среды с физиологической тоничностью по сравнению с клетками, инкубированными перед замораживанием при комнатной температуре.

Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах, как предварительно инкубированных в растворе ПЭО-1500 при низкой положительной и при комнатной температурах, так и после размораживания, сохраняется на уровне контрольных величин, что свидетельствует о структурно-функциональной полноценности клеток. Кроме того, можно отметить, что по содержанию АТФ и 2,3-ДФГ эритроциты кордовой крови не отличаются от эритроцитов донорской (таблица).

Для изучения состояния мембранных белков после криоконсервирования, сохранности их качественного состава и соотношения фракций этих белков был применен метод электрофореза в градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Было показано отсутствие различий в качественном составе и соотношении фракций мембранных белков эритроцитов кордовой и донорской крови. Кроме этого, нами было показано, что процесс обработки эритроцитов кордовой и донорской крови криопротектором ПЭО-1500 при низкой положительной температуре и дальнейшее замораживание-отогрев не вызывало изменений соотношения в изучаемых белковых фракциях по сравнению с интактными эритроцитами.

Таким образом, метод «холодовой» предобработки эритроцитов криопротектором ПЭО-1500 позволяет сохранить структурно-функциональные показатели кордовой крови в такой же степени, как и донорской, и применим для криоконсервирования эритроцитов кордовой крови для дальнейшего их использования в клинических целях.

Адрес для корреспонденции: Тимченко О.Л., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Содержание метаболитов и сохранность эритроцитов кордовой и донорской крови после криоконсервирования с ПЭО-1500.

Объект исследования	Условия эксперимента		Гемолиз, % Нб	Трансфузионная проба, % Нб	Содержание АТФ, мкМ/г Нб	Содержание 2,3-ДФГ, мкМ/г Нб
Эритроциты донорской крови	До замораживания	Контроль	Не наблюдается	0	3,72±0,40	13,3±0,26
		"Холодовая обработка"	Не наблюдается	0,05	3,59±0,26	13,08±0,83
		Обработка при комнатной температуре	Не наблюдается	0,20	3,5±0,42	12,97±0,48
	После размораживания	"Холодовая обработка"	0,93±0,13	12,04±0,83	3,83±0,32	13,06±1,41
		Обработка при комнатной температуре	2,64±0,66	32,25±1,72	3,75±0,32	12,8±1,67
Эритроциты кордовой крови	До замораживания	Контроль	Не наблюдается	0	3,71±0,30	13,4±0,58
		"Холодовая обработка"	Не наблюдается	0,03	3,85±0,35	13,06±1,41
		Обработка при комнатной температуре	Не наблюдается	0,14	3,69±0,47	12,8±1,67
	После размораживания	"Холодовая обработка"	0,77±0,14	11,68±1,30	3,77±0,35	13,05±0,6
		Обработка при комнатной температуре	2,60±0,29	30,96±1,60	3,5±0,49	13,2±1,46

Литература

1. Пат. України № 30888 А Спосіб криоконсервування еритроцитів / Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Сумида С. та ін. Заявл. 16.06.98. Опубл. 15.12.2000. Бюл. № 7, С. 1.20.
2. *Beutler E.* Red cell metabolism/A manual of biochemical methods.—1975.
3. *Шарова Ю.А., Бирюкова Т.В., Шаноян С.А.* Неферментативный метод определения 2,3-дифосфоглицериновой кислоты эритроцитов и возможности его использования в клинической практике // Лабораторное дело.— 1978.— №7.— С.413-415
4. *Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H.* Electrolytic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane// Biochem.— 1971.— Vol. 10.— P. 2606-2617.