Национальная Академия наук Украины,
отделение молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной и клинической физиологии

Институт проблем криобиологии и криомедицины

1

2001

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the Ukraine
Department of Molecular Biology, Biochemistry, Experimental and Clinical Physiology
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

1
2001

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Бондаренко В. А., Коптелов В. А., Лежанин С. Н., Олейник О. А., Рамазанов В. В., Середа Т. П. Зависимость интенсивности транспорта флуоресцеина от температуры среды 3
Кулешова Л. Г., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений 8
Кравченко Л. П., Петренко А. Ю., Сомов А. Ю., Фуллер Б. Д. Дыхательная активность изолированных гепатоцитов при длительном холодовом хранении и последующей нормотермической инкубации 15
Родионова Н. Л., Белоус А. М., Рязанцев В. В., Петренко А. Ю. Изменение активности глутатионзависимых ферментов в ткани слизистой полости рта крыс при различных температурных воздействиях 20
Гордієнко Є. О., Гордієнко О. І., Васильченко Л. І., Коваленко І. Ф., Паніна Ю. Є. Проникність мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини для молекул 1,2-пропандіолу і диметилсульфоксиду в діапазоні позитивних температур 25
Гордиенко Н. А., Безуглый Н. Д., Медведовский А. В., Жерноклев Г. В., Янгс К. Р. Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определение их криорезистентности. III. Осмотический состав бластоцист свиньи 28
Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 35
Моисеева Н. Н., Мазур С. П., Оченашко О. В., Петренко А. Ю. Влияние трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени человека на регенерацию и функции печени крыс после частичной гепатэктомии 42

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ

Бондаренко Т. П., Луговой С. В. Влияние димексида на секретирующую способность тироцитов новорожденных поросят 48
Цуцаева А. А., Ананьина А. Е. Влияние условий хранения на свойства криоконсервированной и лиофилизированной культуры *Streptomyces fradiae* 25Ab12 52
Сандомирский Б. П., Гальченко С. Е., Гальченко Е. С. Влияние температуры и времени хранения на качество молозива коров 60

КРИОМЕДИЦИНА

Караченцев Ю. И., Лях И. А., Македонская В. А. Влияние аллотрансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы на гормональный и иммунный статус больных постоперационным гипотиреозом 65
Мошко Ю. А. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении женщин с хроническими сальпингоофоритами 70
Питько В. А. Динамика биохимических показателей в плазме крови женщин с подострым сальпингоофоритом при трансплантации криоконсервированной хориальной ткани 76

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Мигунова Р. К., Тодрин А. Ф., Капрельянц А. С. Физико-математическая оценка времени замещения льда в замороженной ткани 80
Никишкова И. Н. Влияние предварительного общего умеренного охлаждения на динамику содержания биоэлементов в неокортексе и гиппокампе при обучении 3- и 6-месячных животных 82
Гулевский А. К., Грищенкова Е. А., Рязанцев В. В., Релина Л. И. Влияние холодовой акклимации на фосфолипидный состав личинок большого мучного хрущака *Tenebrio moltor* 84
Зинченко В. Д., Кадникова Н. Г., Ковальчук И. М., Грек А. М. Стерилизация оборудования для криобиологических технологий с помощью озона 86
Полевич В. В. Концепція розробки нового апарата для охолодження пива 88

str.,

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 2000

УДК 612.111.615.361-014.413

UDC 612.111.615.361-014.413

Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500

Л. А. БАБИЙЧУК, Н. Г. ЗЕМЛЯНСКИХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Optimization and Advantages of Washing-out Method for Erythrocytes Cryopreservation with Peo-1500

L. A. BABIJCHUK, N. G. ZEMLYANSKIKH

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

Определена оптимальная концентрация криопротектора ПЭО-1500 для криоконсервирования эритроцитов по разработанному безотмывочному методу, при которой достигается максимальная сохранность клеток после размораживания. Разработан метод удаления криопротектора в случае необходимости трансфузии больших объемов эритромассы. Обоснованы преимущества данного метода по сравнению с существующими.

Визначена оптимальна концентрація кріопротектору ПЕО-1500 для кріоконсервування еритроцитів за розробленим безвідмивним методом, при якій досягається максимальна цілість клітин після розморожування. Розроблено метод видалення кріопротектору у випадку необхідності трансфузії великих об'ємів еритромаси. Обгрунтовано переваги даного методу порівняно з існуючими.

The optimal concentration of PEO-1500 cryoprotectant for erythrocytes' cryopreservation according to the elaborated method was determined, under which the maximum integrity was achieved after thawing. When the transfusion of large erythromass volumes is necessary the method of cryoprotectant removal was worked-out. The advantages of this method in comparison with the existing ones are substantiated.

Долгосрочное хранение клеток крови продолжает оставаться актуальной проблемой современной криобиологии и трансфузиологии. Разработаны различные варианты криоконсервирования клеток донорской крови человека. Наиболее широко вошел в практику низкотемпературных банков нашей страны метод криоконсервирования эритроцитов с ограждающим раствором ЦНИИГПК 11 [1, 2, 5], основу которого составляет глицерин в конечной концентрации 15%. Однако применение глицерина, как и других криопротекторов, хорошо проникающих в клетку и создающих в ней условия гиперосмолярности, обусловливает необходимость удалять криопротектор после размораживания клеток. Это существенно усложняет и удорожает процедуру получения качественных деконсервированных клеток, пригодных для практического применения. Поэтому наиболее перспективно создание безотмывочных методов криоконсервирования эритроцитов с использованием непроникающих в клетку криопротекторов (ГЭК, ПЭГ, ПВП). Однако их применение при замораживании эритроцитов не всегда дает высокие положительные результаты [6, 7, 9], что связано, прежде всего, с отрицательным влиянием этих криопротекторов на структуру плазматической мембраны эритроцитов, которая становится высокопроницаемой для ионов, метаболитов и белков. Это свидетельствует о необходи-

Long-term storage of blood cells has remained to be an actual problem of current cryobiology and transfusiology. Different variants of cell cryopreservation of human donor's blood are elaborated. The methods for erythrocytes preservation with protecting solution, produced by Central R&D Institute of Blood Transfusion [1, 2, 5], is widely introduced into a practice of low temperature banks in our country; glycerol under 15% final concentration is the base of its composition. However, application of glycerol, as well as other cryoprotectants, penetrating into a cell and forming there hyperosmolarity conditions, stipulates the necessity to remove cryoprotectant after cell thawing. This fact significantly complicates and makes more expensive the procedure of the obtaining of qualitative frozen-thawed cells, suitable for practical application. Therefore the creation of washing-out methods for erythrocytes cryopreservation using non-penetrating cryoprotectants (HES, PEG, PVP) is the most perspective way. Their application when freezing erythrocytes sometimes is not efficient [6, 7, 9], that is connected, first of all, to the negative effect of these cryoprotectants on the structure of erythrocytes plasmatic membrane, which becomes highly-penetrating for ions, metabolites and proteins. This fact testifies to the necessity of further improvement of cryopreservation methods, considering damages in membrane structure and cytoskeleton proteins, playing an important role in the maintenance of cell stability

мости дальнейшего усовершенствования методов криоконсервирования, учитывая повреждения мембранных структур и белков цитоскелета, которые играют важную роль в поддержании стабильности клеток и репарации криоповреждений, в цикле замораживания-отогрева клеток.

Нами была испытана эффективность ряда криопротекторов: поливинилпирролидона, гидроксиэтилкрахмала и полиэтиленоксидов различных молекулярных весов. В ходе экспериментов выяснилось, что среди указанных непроникающих криопротекторов наиболее выраженным защитным действием обладает ПЭО-1500, который может использоваться для криоконсервирования клеток [6].

В [8] описан следующий метод криоконсервирования эритроцитов: клетки перед замораживанием одномоментно смешивали с 40%-м водным раствором ПЭО-1500 и выдерживали при температуре 22 °С, после чего их замораживали до –196 °С. Выяснилось, что такой метод обеспечивает сохранность 88% клеток сразу после размораживания, но более 50% эритроцитов подвергаются гемолизу после переноса их в изотонические условия. При использовании этого метода, во-первых, экспонирование эритроцитов с ПЭО-1500 производили при 22 °С, т.е. в условиях, когда текучесть липидов мембран эритроцитов сохраняется на достаточно высоком уровне, что позволяет изменять проницаемость для ионов и биомолекул в процессе химического взаимодействия мембраны и криопротектора. Во-вторых, взвеси эритроцитов с раствором криопротектора смешивали одномоментно и достаточно быстро, а концентрацию криопротектора доводили до конечной при непрерывном его добавлении. Такая процедура приводит к неадекватной дегидратации клеток за время, недостаточное для осмотической и структурной адаптации к действию криопротектора. Кроме того, клетки в процессе добавления криопротектора при 22 °С выдерживали при постоянной его концентрации в течение 30–60 мин, что отрицательно влияло на структурно-функциональные параметры плазматической мембраны клеток. В-третьих, используемый водный раствор ПЭО-1500 не способен обеспечить ионный баланс между внутренней и наружной средой клетки, что приводит к потере части электролитов, а 40%-я концентрация ПЭО-1500 вызывает сильную агглютинацию эритроцитов. Это может в значительной степени влиять на возрастание осмотической хрупкости клеток после переноса в изоосмотические условия. Поэтому при работе с данным криопротектором мы считали необходимым выдержать определенные условия, чтобы "адаптировать" плазматическую мембрану клеток и белки цитоскелета к действию пониженной температуры и этого непроникающего криопротектора с целью предотвратить температурный и осмотический шок [3].

В [4] было показано, что снижение температуры инкубации эритроцитов с ПЭО-1500 до 0 °С и его

and cryodamage reparation, under the cycle of cell freeze-thawing.

The efficiency of the series of cryoprotectants: (polyvinylpyrrolidone, hydroxyethylstarch, polyethyleneoxides of various molecular weight) was tested by us. During the experiment it was revealed, that among the mentioned non-penetrating cryoprotectants PEO-1500, which could be used [6] for cell cryopreservation possessed the most manifested protective effect.

The following method for erythrocytes cryopreservation was described [8]: the cells before freezing were simultaneously mixed with the PEO 40% aqueous solution and stored under 22 °C temperature, then were frozen down to –196 °C. It was revealed, that such a method provided the integrity of 88% of cells just after thawing, but more than 50% of erythrocytes were subjected to hemolysis after their transfer into isotonic conditions. In this method, first of all, erythrocytes exposure with PEO-1500 was carried-out under 22 °C, i.e. under the conditions, when lipid fluidity in erythrocyte membranes was kept at quite a high level, that allowed to change permeability for ions and biomolecules during the process of chemical interaction of a membrane and cryoprotectant. Then, erythrocytes suspension with the cryorpotectant solution was simultaneously and rapidly mixed, and cryoprotectant concentration was gradually approached to the final one when it was added continuously. Such a procedure results in a non-adequate cell dehydration within the period, not enough for osmotic and structural adaptation to the effect cryoprotectant. Besides, the cells within the process of cryoprotectant adding under 22 °C were kept within 30–60 min under its constant concentration, this fact negatively affected the structural and functional parameters of the cell plasmatic membrane. Then, used by us PEO-1500 aqueous solution is not able to provide ionic balance between an inner and outer medium of a cell, which results to the loss of some electrolytes, and 40% PEO-1500 concentration causes a strong agglutination of erythrocytes. This may significantly affect an increase of cell osmotic fragility after their transfer into isoosmotic conditions. Thus, when working with given cryoprotectant we considered, that it was necessary to keep certain conditions for the "adaptation" of the cell plasmatic membrane and cytoskeleton proteins to the effect of the decreased temperature and this nonpeneetrating cryoprotectant with the aim of the temperature and an osmotic shock prevention [3].

It was shown [4], that the temperature decrease of erythrocytes incubation with PEO-1500 down to 0 °C and its dosed introduction into the suspension resulted to the decrease of the number of binding with cells cryoprotectant, correlated with the increase of erythrocytes stability to the effect of freeze-thawing factors. Such a regimen limited the impairment of different cell shapes and promoted to the integrity of the barrier characteristics of plasmatic membrane during the cryopreservation process. It was established,

дированное введение в суспензию приводят к уменьшению количества связывающегося с клетками криопротектора, что коррелирует с увеличением устойчивости эритроцитов к действию факторов замораживания-отогрева. Такой режим ограничивает повреждение различных форм клеток и способствует сохранению барьерных свойств плазматической мембраны в процессе криоконсервирования. Установлено, что повышение устойчивости эритроцитов после обработки при 0 °С по сравнению с инкубацией при 22 °С во многом определяется модификацией белков цитоскелета, которые удерживают форму и объем клеток в данных экспериментальных условиях.

Исходя из этого был разработан принцип "холодовой стабилизации" эритроцитов перед криоконсервированием, заключающийся в том, что после удаления плазмы к эритромассе при 0 °С дозированно добавляют раствор криопротектора ПЭО-1500. Такой режим подготовки способствует повышенной устойчивости клеток к последующему замораживанию-отогреву, что проявляется в снижении уровня гемолиза сразу после отогрева суспензии и особенно в уменьшении осмотической хрупкости клеток после переноса их в среды с физиологической тоничностью по сравнению с клетками, преинкубированными перед замораживанием при комнатной температуре.

В связи с вышеизложенным целью данной работы было определение оптимальной концентрации криопротектора ПЭО-1500 для криоконсервирования эритроцитов, разработка метода удаления криопротектора при необходимости переливания больших объемов эритромассы, а также сравнение разработанного безотмывочного метода криоконсервирования с существующими.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, заготовленные на консерванте Глюгицир 7б. Основой растворов ПЭО-1500 были 150 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, *pH* 7,4. Эритроциты после удаления плазмы обрабатывали криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С дозированно в течение 40 мин, 1:1 по объему. После этого клетки замораживали до –196 °С в пластиковых одноразовых контейнерах, размораживали на водяной бане при температуре 42–44 °С с постоянным их покачиванием. Эксперименты были проведены на больших объемах крови (400–600 мл).

Выживаемость эритроцитов после размораживания рассчитывали по формуле

$$\mathrm{Rec} = \frac{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V}{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V + \mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}\, V_{\mathrm{super}}} \cdot 100\%,$$

где Hg_{RBC} — концентрация гемоглобина в эритромассе; V — объем эритромассы; $\mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}$ — концентрация гемоглобина в супернатанте; V_{super} — объем супернатанта.

that an increase of erythrocytes stability after the treatment under 0#C in comparison with the incubation under 22 °C is mainly, determined by the modification of protein cytoskeleton, which keep cellular shape and volume under given experimental conditions.

The principle of erythrocytes cold "stabilization" before cryopreservation, consisting in the fact, that after the plasm removal under 0 °C the solution of PEO-1500 cryoprotectant is added by dose to erythromass. Such a preparation regimen promotes to the increased cell stability to further freeze-thawing, what is manifested in the decrease of hemolysis level just after the suspension thawing and especially in the decrease of cell osmotic fragility after their transfer into the medium with physiological tonicity in comparison with the cells, preliminary incubated before freezing under a room temperature.

Taking into consideration the data, mentioned above, the aim of given work was the determination of the optimum concentration of PEO-1500 cryoprotectant for erythrocytes cryopreservation, the elaboration of the method for cryoprotectant removal when the transfusion of erythromass of big volume is necessary, as well as the comparing of the elaborated washing-out method for cryopreservation with existed ones.

Erythrocytes of human donors' blood, prepared on 7b Glugicyr cryoprotectant were the objects under study. 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, *pH* 7.4 were the base of PEO-1500 solutions. Erythrocytes after plasm removal were treated by PEO-1500 cryoprotectant under 0 °C by dosage within 40 min, on the volume of 1:1. Then the cells were frozen down to –196 °C in plastic disposable containers, thawing was carried-out on a water base under 42–44 °C temperature with their regular swinging. Experiments were conducted with big volumes of blood (400–600 ml).

Erythrocytes recovery after thawing was calculated by the formula:

$$\mathrm{Rec} = \frac{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V}{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V + \mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}\, V_{\mathrm{super}}} \cdot 100\%,$$

where — hemoglobin concentration in erythromass; V — volume of erythromass; $\mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}$ — hemoglobin concentration in supernatant; V_{super} — volume of supernatant.

Osmotic fragility was calculated by the formula:

$$100\% - \frac{\mathrm{Hg}_{\mathrm{total}}\, V - \mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}\, V_{\mathrm{super}}}{\mathrm{Hg}_{\mathrm{total}}\, V} \cdot 100\%\ ,$$

where $\mathrm{Hg}_{\mathrm{total}}$ — hemoglobin concentration in blood; V — volume of blood.

When detecting optimum concentration of PEO-1500 for erythrocytes cryopreservation the series of solutions with the increasing concentrations (20, 25, 30, 35, 40%) were used.

Осмотическую хрупкость определяли после переноса аликвоты криоконсервированных эритроцитов в физиологический раствор NaCl в соотношении 1:10 и оценивали процент погибших клеток. Расчет проводили по формуле

$$100\% - \frac{Hg_{total}\,V - Hg_{super}\,V_{super}}{Hg_{total}\,V} \cdot 100\%,$$

где Hg_{total} – концентрация гемоглобина в крови; V – объем крови.

При определении оптимальной концентрации криопротектора ПЭО-1500 для криоконсервирования эритроцитов был использован ряд растворов нарастающих концентраций (20, 25, 30, 35, 40%).

Как видно из данных, представленных в табл. 1, максимальная сохранность клеток после размораживания и переноса в 0,15 М NaCl наблюдалась в 30%-м растворе ПЭО-1500. Исходя из этого можно заключить, что наиболее оптимальным защитным раствором для криоконсервирования эритроцитов является 30%-й раствор ПЭО-1500.

Таблица 1

Выживаемость эритроцитов после размораживания в зависимости от концентрации ПЭО-1500

Концентрация ПЭО-1500, %	Выживаемость клеток после размораживания, %	Осмотическая хрупкость после переноса в 0,15 М NaCl, %
20	89	55
25	98	35,6
30	99	23
35	98	27
40	Hg_{RBC} не определяли из-за сильной агглютинации клеток	63

В настоящее время показано, что ПЭО молекулярной массы от 400 до 4 000 относится к веществам низкой токсичности. При изучении зависимости токсического эффекта ПЭО от его молекулярной массы было установлено, что с увеличением последней токсичность полимера понижается [6]. Сейчас накоплена значительная информация о токсичности ПЭО при однократном и повторном внутривенном введении. Получить указанные данные очень важно для решения вопроса о предельно допустимых дозах полимера в связи с использованием его в качестве криопротектора, не требующего отмывания из размороженной клеточной взвеси перед трансфузией. Опыты на мышах, крысах, кроликах показали [6], что безопасным является внутривенное введение им раствора ПЭО разных молекулярных масс в 10–15%-й концентрации и дозах до 1 г/кг массы животного. В течение первых суток основная масса препарата в неизменном состоянии выводится из организма. Куммулятивное действие ПЭО не установлено.

Особого внимания заслуживает исследование токсико-фармакологической характеристики ПЭО-1500 в связи с перспективой применения его в качестве криопротектора при криоконсервировании эритро-

As the Table 1 showed, the maximum integrity o cells after thawing and their transfer into 0.15 M NaC was observed in the 30% PEO-1500 solution. Takin into consideration this fact, it should be concluded that the 30% solution of PEO-1500 is the most opti mum protective solution for erythrocytes cryopreser vation.

Table 1

Erythrocytes viability after thawing depending on th PEO-1500 concentration

PEO-1500 concentration, %	Cell viability after thawing, %	Osmotic fragility after the transfer into 0.15 M NaCl, %
20	89	55
25	98	35,6
30	99	23
35	98	27
40	Hg_{RBC} was not determined due to intensive cell agglutination	63

Nowadays it was shown that PEO with the mo lecular mass from 400 to 4 000 was considered as th substance with low toxicity. When studying depen dence of the toxic effect of PEO on its molecular mas it has been established, that polymer toxicity de creased together with its increase [6]. A significan information about PEO toxicity under its single an repeated intravenous injection was accumulate nowadays. It is very important to obtain this informa tion for solving the question on the maximum assume doses of polymer in respect of its usage as a cryopro tectant, which does not require washing-out from frozen-thawed suspension before transfusion. Experi ments in mice, rats and rabbits demonstrated [6], tha intravenous injection of PEO with various molecula masses in 10–15% concentrations to them in the dose up to 1 g/kg of the mass of animal was safe. Withi the first two days the main mass of the preparation i a permanent state is removed from an organism. Cu mulative effect of PEO was not established.

The investigation of toxico-pharmacological cha racteristics of PEO-1500 in respect of the perspectiv of its application as a cryoprotectant under erythro cytes cryopreservation without following washing-ou of the frozen-thawed cells is of great importance. Th data on PEO-1500 toxicity during its intravenou injection were obtained at the Institute for Problem of Cryobiology and Cryomedicine of the Nationa Academy of Sciences of the Ukraine [7]. It has bee established that the 1/20th–1/30th DL_{50} of the dose of PEO-1500 are considered as assumed for parenter injection with frozen-thawed erythro-polyethylen oxide mixture and recommended for clinical invest gation of the cryoprotectant. Such a quantity of PEC 1500 can comprise 0.5–1.0 l of frozen-thawed erythro cyte suspension. The necessity of removal of th PEO-1500 surplus after erythrocytes' thawing can ap pear if the application of big quantity of erythroma is recommended. In this connection we carried-out th

цитов без последующего отмывания оттаянных клеток. Данные о токсичности ПЭО-1500 при внутривенном введении получены в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [7]. Было установлено, что дозы 1/20–1/30 DL_{50} ПЭО-1500 считаются допустимыми для парентерального введения с оттаянной эритроцито-полиэтиленоксидной смесью и рекомендованы для клинического изучения криопротектора. Такое количество ПЭО-1500 может содержать 0,5–1,0 л оттаянной эритроцитарной взвеси. Если в клинической ситуации показано применение большого объема эритроцитарной массы, может возникнуть необходимость удаления избытка ПЭО-1500 после размораживания эритроцитов. В связи с этим нами были проведены эксперименты для подбора определенных оптимальных условий удаления криопротектора ПЭО-1500 после размораживания эритроцитов. При этом мы исходили из следующих рассуждений:

1) ПЭО-1500 является непроникающим в клетки криопротектором и, следовательно, при его добавлении в них не создаются условия гиперосмолярности, как в случае с проникающими криопротекторами, а это значит, что для удаления ПЭО-1500 убывающие концентрации гипертонических растворов NaCl (как при отмывании глицерина) не являются необходимыми;

2) при переливании размороженной взвеси эритроцитов в русло крови реципиента клетки попадают в изотонические условия;

3) разработанный нами метод холодовой "стабилизации" эритроцитов в значительной степени повышает осмотическую устойчивость клеток при переносе их в среды с физиологической тоничностью.

Поэтому для удаления криопротектора после размораживания эритроцитов мы использовали физиологический раствор NaCl, который добавляли к суспензии в равном объеме, перемешивали и центрифугировали при 1 000 об/мин в течение 10 мин, после чего надосадок удаляли. Выживаемость эритроцитов составляла после размораживания 98,8, после удаления ПЭО-1500 – 89,2%, а осмотическая хрупкость – 19,4%. Эти данные свидетельствуют, что если необходимо переливать большой объем крови, замороженной по разработанному методу, избыток ПЭО-1500 может быть довольно просто и быстро удален из размороженной взвеси. При этом эритроциты сохраняют хорошую выживаемость, а осмотическая хрупкость их не превышает допустимых для трансфузии величин.

Как уже было сказано выше, в настоящее время для криоконсервирования эритроцитов донорской крови в нашей стране и за рубежом широко применяется глицериновый метод. Этот метод требует больших материальных затрат и является довольно трудоемким в связи с трехкратным отмыванием эритроцитов перед трансфузией.

experiments for the selection of optimum conditions for the removal of PEO-1500 cryoprotectant after erythrocytes freeze-thawing. In our discussions we proceeded from the following factors:

1) PEO-1500 is non-penetrating into cells cryoprotectant and, therefore, there are no hyperosmolarity conditions after its adding to them, as in the case with penetrating cryoprotectants, and this means, that for the removal of PEO-1500 the decreasing concentrations of NaCl hypertonic solutions (in the case with glycerol washing-out) are not essential;

2) during the transfusion of frozen-thawed erythrocytes suspension into the recipient's blood channel the cells occur under isotonic conditions;

3) the method for erythrocytes' cold "stabilization" elaborated by us, significantly increases cell osmotic stability under their transfer into the media with physiological tonicity.

Thus, for the cryoprotectant removal after erythrocytes' freeze-thawing, NaCl physiological solution we used NaCl physiological solution, added to the suspension in an equal volume, mixed and centrifuged at 1 000 rot/min within 10 min. Then supernatant was removed. Erythrocytes survival after thawing made 98.8%, after the removal of PEO-1500 it was 89.2%, osmotic fragility made 19.4%. These data testify, that PEO-1500 surplus can be quite simply and rapidly removed from the frozen-thawed suspension, if it is necessary to transfuse a big volume of blood. Thereat erythrocytes keep a high viability, and their osmotic fragility did not exceed the values, permissible for transfusion.

As it was mentioned above, nowadays the glycerol method, is widely applied for erythrocytes cryopreservation of donor's blood in our country and abroad. This method require significant expenses and it is labor-consuming due to the three-fold washing-out of erythrocytes before the transfusion.

The works [9] on the elaboration of the washing-out method for erythrocytes cryopreservation on the base of hydroxyethylstarch non-penetrating cryoprotectant with 200 000 m.m., used in 25% concentration, are carried-out. In this connection we considered, that a comparative study of the washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 elaborated by us, and other methods was necessary.

Experiments were conducted with big volumes of blood (total volume of the suspension – 400 ml), freezing was carried-out in plastic containers. In the experiments 30% PEO-1500 under 0 °C within 40 min, 30% glycerol and 25% hydroxyethylstarch with 200 000 m.m. were added to 200 ml of erythromass after plasm removal. Then the cells were frozen by containers immerging into a liquid nitrogen. Thawing was carried-out according to the mentioned above method. The data obtained (Table 2) testify, that the

Ведутся работы [9] по созданию безотмывочного способа криоконсервирования эритроцитов на основе непроникающего криопротектора гидроксиэтилкрахмала с м.м. 200 000, который используется в 25%-й концентрации. В связи с этим мы считали необходимым сравнить разработанный нами безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 с другими методами.

Эксперименты выполняли на больших объемах крови (общий объем суспензии – 400 мл), замораживание проводили в пластиковых контейнерах. В опытах после удаления плазмы к 200 мл эритромассы добавляли: 30%-й ПЭО-1500 при 0 °С в течение 40 мин; 30%-й глицерин; 25%-й гидроксиэтилкрахмал с м.м. 200 000, после чего клетки замораживали погружением контейнеров в жидкий азот. Размораживание проводили, как было описано выше. Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют, что наиболее высокая выживаемость клеток после размораживания наблюдается у эритроцитов, замороженных по разработанному нами методу, и она практически в 2 раза выше, чем у клеток, криоконсервированных с гидроксиэтилкрахмалом.

Таблица 2

Выживаемость эритроцитов, криоконсервированных различными методами, после размораживания

Выживаемость эритроцитов, %		
30%-й ПЭО-1500	30%-й глицерин	25%-й ГЭК
98,0	91,2	46,0
98,8	92,0	56,8
98,9	94,2	54,9
95,8	89,8	40,1
97,9	91,8	49,5

Поскольку при использовании глицерина клетки после размораживания необходимо отмыть, а большой гемолиз при криоконсервировании с ГЭК также требует отмывания эритроцитов, мы провели эксперименты, в которых эритроциты после размораживания отмывали следующим образом:

1) к суспензии эритроцитов с ПЭО-1500 добавляли равный объем 0,9%-го NaCl, как это было разработано для удаления криопротектора, и центрифугировали;

2) суспензию эритроцитов с глицерином центрифугировали, надосадок удаляли и к осадку добавляли равный объем 3,5%-го NaCl, затем центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 5 мин, после чего еще дважды отмывали 0,9%-м NaCl согласно стандартной процедуре для глицеринового метода;

3) к суспензии эритроцитов с ГЭК добавляли равный объем 0,9%-го NaCl, центрифугировали, однако при большом гемолизе после отмывки требовалось повторное отмывание.

Выживаемость эритроцитов после размораживания и последующего отмывания составляла: с

highest cell viability after thawing is observed in the erythrocytes, frozen on the method elaborated by us; this viability is practically twice higher in comparison with the cells, cryopreserved with hydroxyethylstarch.

Table 2

Erythrocytes viability, cryopreserved by different methods after thawing

Erythrocytes viability, %		
30% PEO-1500	30% glycerol	25% HES
98.0	91.2	46.0
98.8	92.0	56.8
98.9	94.2	54.9
95.8	89.8	40.1
97.9	91.8	49.5

Since it is necessary to wash-out the cells after freeze-thawing when using glycerol, and intensive hemolysis during cryopreservation with HES also require erythrocytes washing-out, we have conducted the experiments, where erythrocytes after thawing were washed-out according to the following method:

1) an equal quantity of 0.9 NaCl, as it was elaborated for cryoprotectant removal, was added to erythrocytes suspension;

2) erythrocytes suspension with glycerol was centrifuged, supernatant was removed and an equal quantity of 3.5% NaCl was added to supernatant, then centrifuged under 3 000 rot/min within 5 min, twice washed-out by 0.9% NaCl according to the standard procedure for the glycerol method;

3) an equal quantity of 0.9% NaCl was added to the erythrocytes suspension with HES, centrifuged, however, under an intensive hemolysis after washing-out the secondary washing-out was required.

Erythrocytes viability after thawing and further washing-out made: with PEO-1500 – 86.2 ± 3.2, with glycerol – 87.1 ± 2.8, with HES – from 7.1 to 29.4%.

The data obtained testify, that the washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500, elaborated by us, allows to increase significantly the cells viability after thawing and especially after their transfer into the media with physiological tonicity (in comparison with the other methods for erythrocytes cryopreservation with non-penetrating cryoprotectants), to make the procedure of obtaining of qualitative frozen-thawed cells cheaper and more simple comparing to the methods for erythrocytes cryopreservation with non-penetrating cryoprotectants, which require their removal from cells after thawing.

Thus the washing-out method for erythrocytes cryopreservation, elaborated by us, is more perspective in comparison with the existed ones, and can find a wide application in a practical medicine. Thereat the question of the increase of cell stability to the effect of low temperature and osmotic factors, as well as

ПЭО-1500 – 86,2 ± 3,2, с глицерином – 87,1 ± 2,8, с ПЭК – от 7,1 до 29,4%

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанный безотмывочный способ криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 позволяет в значительной степени повысить выживаемость клеток после размораживания и особенно после перенноса их в среды с физиологической тоничностью (по сравнению с существующими методами криоконсервирования эритроцитов с непроникающими криопротекторами), а также в значительной степени упрощает и удешевляет процедуру получения качественных деконсервированных клеток по сравнению с методами криоконсервирования эритроцитов с проникающими криопротекторами, требующими удаления их из клеток после размораживания.

Таким образом, разработанный нами безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов является более перспективным по сравнению с существующими и может найти широкое применение в практической медицине. При этом остается открытым вопрос о детальных механизмах повышения устойчивости клеток к действию низкотемпературных и осмотических факторов, а также замораживания в условиях предварительного экспонирования эритроцитов при 0 °С и циклического введения ПЭО-1500.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аграненко В. А., Виноград-Френкель Ф. Р., Федорова Л. И. и др.* Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии: Метод. рекомендации.– М.: МЗ СССР, 1980.– 47 с.
2. *Аграненко В. А., Федорова Л. И.* Замороженная кровь и ее клиническое применение.– М.: Медицина, 1983.– 96 с.
3. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др.* Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.– 1985.– № 2.– С. 25–32.
4. *Белоус А. М., Гулевский А. К., Бабийчук Л. А. и др.* Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология.– 1990.– № 4.– С. 3–14.
5. *Виноград-Френкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. Р. и др.* Усовершенствование криоконсервирования эритроцитов при ультранизких температурах (от –150 до –196 °С) // Пробл. гематологии и переливания крови.– 1980.– № 9.– С. 19–23.
6. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
7. *Терехов Н. Т., Петров М. М.* Клиническое применение консервированных эритроцитов.– Киев: Здоров'я, 1979.– 166 с.
8. *А.с. № 560613*, СССР. Способ консервирования эритроцитов / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, Л. П. Бредихина и др. Заявлено 30.10.75. Опубл. 20.07.77. Бюл. № 21.– С. 18.
9. *Sputtek A., Warnken U. N., Larger R. et al.* Hydroxyethyl starch plasma concentration profiles after administration of HES protected frozen erythrocytes // Abstr. 31st annual meeting of Society for Cryobiology.– Kyoto, Japan, 1994.– P. 97.

Поступила 23.01.2001

freezing under the conditions of the erythrocytes preliminary exposure under 0 °C and cyclic introduction of PEO-1500 remained to be opened.

REFERENCES

1. *Agranenko V. A., Vinograd-Frenkel F. R., Fedorova L. I. et al.* The methods for long-term storage under the frozen state of erythrocytes for transfusion: Method. Recommendations.– M.: Ministry of Health Care of the USSR, 1980.– 47 p.
2. *Agranenko V. A., Fedorova L. I.* Frozen blood and its clinical application.– M.: Meditsina, 1983.– 96 p.
3. *Belous A. M., Bondarenko V. A., Babijchuk L. A. et al.* United method of cell damage under the thermal shock, freezing and posthypertonic lysis // Kriobiologia.– 1985.– № 2.– P. 25–32.
4. *Belous A. M., Gulevsky A. K., Babijchuk L. A. et al.* The role of cytoskeletal proteins in the change of cell stability under the temperature and osmotic effect // Kriobiologia.– 1990.– № 4.– P. 3–14.
5. *Vinograd-Frenkel F. R., Fedorova L. I., Semenova N. R. et al.* Advancing of erythrocytes cryopreservation under ultra-low temperatures (from –150 to –196 °C) // Problems of Hematology and Blood Transfusion.– 1980.– № 9.– P. 19–23.
6. *Pushkar N. S., Shrago M. I., Belous A. M., Kalugin Yu. V.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova Dumka, 1978.– 204 p.
7. *Terekhov N. T., Petrov M. M.* Clinical application of cryopreserved erythrocytes.– Kiev: Zdorovya, 1979.– 166 p.
8. *Author's* certificate № 560613, USSR. The way of erythrocytes cryopreservation / N. S. Pushkar, M. I. Shrago, L. P. Bredihina et al. Manifested 30.10.75. Published 20.07.77. Bul. № 21.– P. 18.
9. *Sputtek A., Warnken U. N., Larger R. et al.* Hydroxyethyl starch plasma concentrations profiles after administration of HES protected frozen erythrocytes // Abstr. 31st Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Kyoto, Japan, 1994.– P. 97.

Accepted in 23.01.01