

УДК 57.043: 611.018.51: 547.42

**Рамазанов В.В., Воловельская Е.Л., Нипот Е.Е.,
Ершов С.С., Ершова Н.А., Руденко С.В., Бондаренко В.А.**

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ОТМЫТЫХ ПОСЛЕ БЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ В СРЕДЕ С САХАРОЗОЙ И 1,2-ПРОПАНДИОЛОМ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Трансфузия эритроцитов после длительного гипотермического хранения (ГТХ) не всегда нормализует гемодинамику и может приводить к развитию посттрансфузионного системного воспаления. Замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте (-196°C) позволит исключить длительное ГТХ и, возможно, предупредить воспалительный процесс. В работе показано, что замораживание эритроцитов в среде, содержащей 1,2-ПД (22%), сахарозу (10%) и невысокую концентрацию NaCl (0,27%) обеспечивает сохранение осмотических и морфологических характеристик. Кроме того, сохраняется клеточный АТФ на уровне 77%, который необходим для осуществления эритроцитами функции регуляции сосудистого тонуса. Эффективность комбинированного криоконсерванта, вероятно, связана с тем, что на стадии замораживания проникающий криопротектор (1,2-ПД) противодействует «критическому» сжатию клеток, значительный вклад в которое вносит концентрирование сахарозы. Вместе с тем, при оттаивании сахараза предотвращает чрезмерное увеличение объема клеток. В сумме происходит ослабление гипертонического и осмотического стресса на клетки, что обуславливает сохранение осмотических характеристик и АТФ.

Ключевые слова: эритроциты, замораживание, морфология, АТФ.

Данная работа является фрагментом темы «Исследование чувствительности эритроцитов животных к охлаждению, дегидратации и замораживанию при действии модифицирующих факторов и криопротекторов», № гос. регистрации 0114U0001318.

У больных с неотложным состоянием при переливании эритроцитов после длительного гипотермического хранения (ГТХ) не всегда нормализуется гемодинамика и поставка кислорода тканям [10], что связано со снижением уровня АТФ и 2,3-ДФГ при ГТХ [8;13]. Кроме того, трансфузия ГТХ-эритроцитов может приводить к летальному исходу, связанному с развитием посттрансфузионного системного воспаления, вследствие разрушения эритроцитов и освобождения ионов железа, которые стимулируют синтез провоспалительных цитокинов [10]. Замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте (-196°C) позволит исключить длительное ГТХ и, возможно, ослабит негативные последствия, включая развитие воспаления.

Препарат «Пропандиосахароль» (ПДС: 37% 1,2-ПД, 3% сахароза, 0,6% NaCl) является эффективным криоконсервантом для эритроцитов и обеспечивает сохранение их лечебной полноценности после размораживания [4]. Вместе с тем, для замораживания эритроцитов с ПДС необходима невысокая скорость охлаждения (12-14°C/мин) до температуры -150÷-170°C, что обеспечивается металлическим чехлом, надетым на контейнер с эритро массой при погружении и выдерживании в жидком азоте (-196°C) в течении 12-15 мин. Оттаивание эритро массы производят двухэтапно. 1-й этап: оттаивание со скоростью 4-5°C/мин до -80÷-110°C, что обеспечивается выдерживанием контейнера в пенопластовом чехле в течение 15-20 мин. 2-й этап: контейнер с эритро массой погружают в водяную баню при +42÷+45°C на 45-60 сек до полного

размораживания эритроцитов [1].

Упрощение данной технологии замораживания-оттаивания может быть связано с изменением состава компонентов криоконсерванта ПДС. Показано, что быстрое замораживание эритроцитов в изотонической сахарозо-солевой среде (7% сахарозы+0,3% NaCl) с 1,2-ПД, обеспечивает ослабление осмотического стресса на клетки при быстром оттаивании [5]. Подобный состав криоконсерванта позволит получить замороженные эритроциты с нормальными свойствами.

Цель работы

Исследовать осмотические и морфологические характеристики замороженных эритроцитов при использовании режима быстрого замораживания-оттаивания в среде с сахарозой и 1,2-ПД с невысоким содержанием NaCl.

Объект и методы исследования

В работе использовали NaCl (х.ч.); сахарозу (х.ч.); 1,2-пропандиол (1,2-ПД, фарм.). Среды замораживания содержали 22% 1,2-ПД, 10% сахарозы и 0,27% NaCl. Донорскую кровь II группы получали на Харьковской областной станции переливания крови. После удаления плазмы эритроциты три раза отмывали охлажденным (4-6°C) физиологическим раствором соли (0,9% NaCl) при центрифугировании 3000 об/мин. Гематокрит осадка эритро массы составлял 70-74%.

Образцы эритроцитов в криоконсерванте объемом 1 мл с гематокритом 35-37% в полиэтиленовых капсулах инкубировали 40 мин при

25-27°C, погружали в жидкий азот (-196°C, скорость замораживания 180-300°C/мин) и выдерживали в течении 5 мин. Капсулы после замораживания переносили на водяную баню при 40°C на 2-3 мин (процедура быстрого замораживания-оттаивания).

После отогрева размороженные образцы эритроцитов (1 мл) переносили в центрифужные пробирки, которые помещали на водяную баню (37°C) и медленно, с перемешиванием, разводили теплым (37°C) физиологическим раствором NaCl до 10 мл. 50 мкл полученной клеточной суспензии гемолизировали в 950 мкл H₂O – данный образец использовался для тестирования оптической плотности гемолизата всех клеток (ОП_{100%}). Остаток суспензии (9,95 мл) центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин с последующим удалением надосадочного гемолизата (1-е отмывание). Полученный осадок эритроцитов помещали на водяную баню и медленно, с перемешиванием, разводили теплым физиологическим раствором NaCl до 10 мл с последующим центрифугированием и удалением надосадочного гемолизата (2-е отмывание). Полученный осадок клеток, без учета скорости разведения, доводили физраствором до 10 мл и перемешивали. Из полученной суспензии отбирали 50 мкл, которые гемолизировали в 950 мкл H₂O – данный образец использовался для тестирования оптической плотности гемолизата оставшихся клеток (ОП_{ост}). Остаток суспензии центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин с последующим удалением надосадочной жидкости (3-е отмывание). Полученный осадок эритроцитов использовали в последующих экспериментах.

Вычисление суммарной степени потери эритроцитов в результате замораживания-оттаивания-отмывания осуществляли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = 100 - [100 \times \text{ОП}_{\text{ост}} / \text{ОП}_{100\%}],$$

Представленная методика позволяет исключить определение степени потери эритроцитов на каждом этапе отмывания. Данная формула основывается на формуле вычисления % гемолиза в супернатанте образцов после их замораживания-оттаивания и центрифугирования: $100 \times \text{ОП}_{\text{экс}} / \text{ОП}_{100\%}$, где ОП_{экс} – оптическая плотность супернатанта экспериментального образца; ОП_{100%} – оптическая плотность при полном гемолизе образца [9].

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в средах с различной концентрацией NaCl

(0,09-0,9%). Клетки в среде объемом 1мл с гематокритом 0,2-0,3% инкубировали 30 мин при 20-22°C, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин. Процент гемолиза эритроцитов в супернатанте осуществляли по вышепредставленной формуле:

100×ОП_{экс}/ОП_{100%}.
Содержание АТФ определяли по следующей формуле [3]:

$\text{АТФ} = (\Phi_{\text{кр}} - \Phi_{\text{н}}) / 2$, (мкмоль/г Hb), где: Φ_н – концентрация неорганического фосфора в ТХУ-экстракте эритроцитов (мкмоль/г Hb), Φ_{кр} – концентрация фосфора после кислотного гидролиза ТХУ-экстракта на кипящей водяной бане (7 мин). Данный гидролиз производит отщепление 2-х фосфатных групп от молекулы АТФ с образованием молекулы АМФ [3].

Поскольку оценка содержания АТФ основывается на определении изменения уровня неорганического фосфора, то после замораживания-оттаивания эритроциты не отмывались от криоконсерванта.

Концентрацию гемоглобина определяли на длине волны λ=415 нм [12].

Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при p < 0,05 [2].

Результаты исследования и их обсуждение

При замораживании эритроцитов в среде, содержащей 22% 1,2-ГД, 10% сахарозы и 0,27% NaCl и последующем отмывании потери по гемолизу составляют 5±1,5%. После замораживания-оттаивания эритроцитов (без отмывания) отмечается снижение уровня АТФ до 77,2 % от контроля (контроль – 3,47±0,46 мкмоль/г Hb; замороженные – 2,68±0,35 мкмоль/г Hb).

Исследование осмотического гемолиза не выявило значительной разницы в кривых гемолиза между замороженными и интактными эритроцитами (рис. 1).

Морфологические эксперименты показали, что в среде, содержащей 0,9% NaCl, интактные эритроциты представлены в основном стоматоцитами, а замороженные клетки – эхиноцитами и сфероэхиноцитами. Включение в среду альбумина (2-3%) вызывает изменение формы интактных и замороженных клеток в основном на дискоциты, хотя в замороженных образцах в большей степени присутствуют стоматоциты и эхиноциты (рис. 2). Следовательно, замороженные эритроциты с определенной степенью сохраняют функцию восстановления формы.

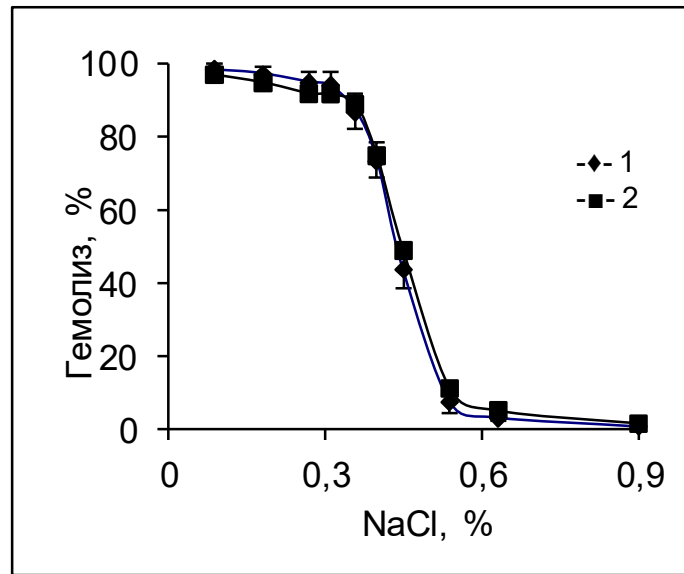


Рис. 1. Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации NaCl: 1 – intactные клетки; 2 – замороженные клетки.

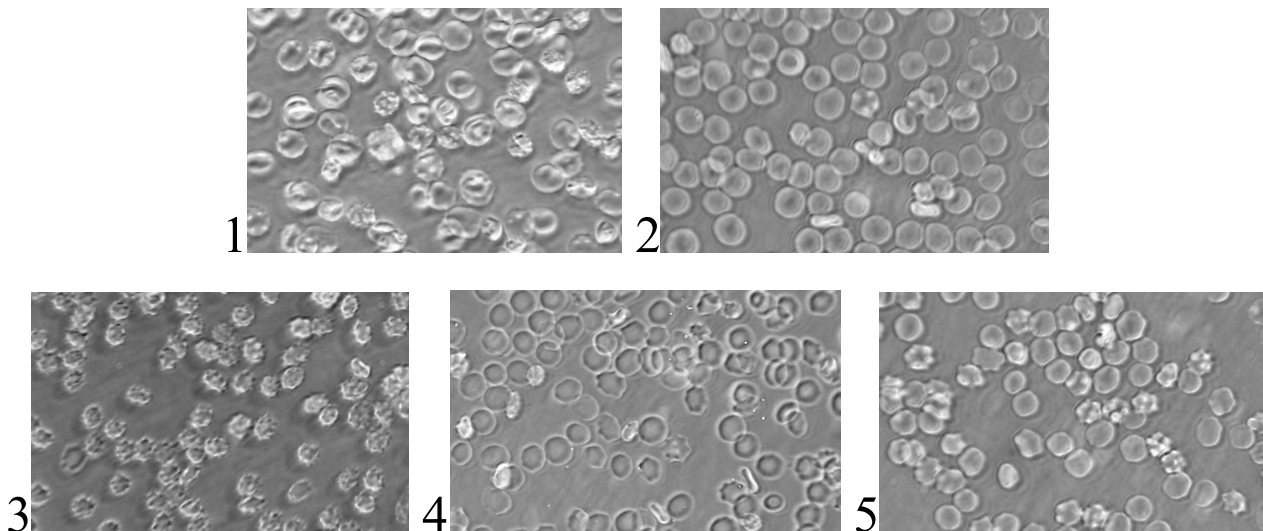


Рис. 2. Морфология эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl: 1,2 – intactные клетки; 3,4,5 – замороженные клетки. В среду добавлен альбумин: 2,4 – 2%, 5 – 3%.

При неотложном состоянии пациентов переливание ГТХ-эритроцитов не всегда обеспечивает нормализацию гемодинамики и поставки кислорода тканям [10], что может быть связано как с потерей АТФ [13], так и со снижением уровня 2,3-ДФГ [8]. В системе микроциркуляции в тканях АТФ высвобождается из эритроцитов, связывается с рецепторами на эндотелиальных клетках и стимулирует повышение уровня оксида азота (NO), что способствует дилатации микрососудов, перфузии тканей и поставке кислорода [13]. При замораживании-оттаивании эритроцитов в среде с декстраном отмечается потеря АТФ более чем на 50% [11]. В то же время, замораживание эритроцитов в комбинированной среде с декстраном и 1,2-ПД обеспечивает сохранение АТФ на уровне 74,6% по сравнению со

средой, содержащей только декстран – 44,8% [6]. Быстрое замораживание эритроцитов в комбинированной среде декстран+1,2-ПД способствует ослаблению осмотического стресса на клетки при быстром оттаивании [5], при этом отмытые клетки имеют нормальные осмотические характеристики (проницаемость ионов H^+ , осмотическая хрупкость) [7]. Среда сахара+1,2-ПД также обеспечивает ослабление осмотического стресса на эритроциты при оттаивании клеточных образцов [5].

Следовательно, сохранение осмотических свойств эритроцитов при быстром замораживании-оттаивании в комбинированных средах способствует сохранению большего уровня АТФ.

Выводы

При использовании режима быстрого замораживания-оттаивания эритроцитов в среде с 1,2-ПД (22%) и сахарозой (10%) при невысоком содержании NaCl (0,27%) и последующем отмыванием физиологическим раствором NaCl обеспечивается сохранность клеток на уровне 95%, сохраняется их осмотическая устойчивость. Кроме того, сохраняется функция восстановления морфологии и АТФ на уровне 77,2 % от контроля. Полученные экспериментальные данные согласуются с тем, что использованный криоконсервант обеспечивает ослабление осмотического стресса на клетки при размораживании эритроцитов, что обуславливает сохранение осмотических характеристик и АТФ.

Перспективы дальнейших исследований

В последующей работе планируется исследовать осмотические и биохимические характеристики эритроцитов, замороженных в сахарозо-солевой среде с 1,2-ПД в образцах с большими объемами (120 мл).

Литература

1. А. с. № 888896 СССР, МКИ⁴ А 01N1/02. Способ криоконсервирования эритроцитов / А.М. Воротилин, М.М. Гучок, В.А. Моисеев и др. – Оpubл. 15.12.81, Бюл. №46.
2. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И.П. Ашмарин, И.П. Васильев, В.А. Амбросов. – Л. : Из-во Ленингр. ун-та, 1975. – 76 с.

3. Виноградова И.Л. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах / И.Л. Виноградова, С.Ю. Багрянцева, Г.В. Дервиз // Лаб. дело. – 1980. – № 7. – С. 424–426.
4. Гучок В.М. Лечебная эффективность эритроцитов, криоконсервированных под защитой препарата «Пропандиосахароль» / В.М. Гучок, А.М. Воротилин, В.И. Луговой, М.И. Шраго // Проблемы криобиологии. – 1994. – № 4 – С. 44–47.
5. Рамазанов В. В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом / В. В. Рамазанов // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 155–163.
6. Рамазанов В.В. Определение содержания аденозинтрифосфата и 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах донорской крови при замораживании / В. В. Рамазанов, В.А. Бондаренко // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2016. – Т. 16, Вип. 1 (53) – С. 233–237.
7. Рамазанов В.В. Эффективность комбинированных криоконсервантов, содержащих глицерин или 1,2-пропандиол при замораживании эритроцитов / В. В. Рамазанов // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 2 – С. 125–136.
8. Högman C.F. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate / C.F. Högman, H. Löf, H.T. Meryman // Transfusion. – 2006. – Vol. 46, № 9. – P. 1543–1552.
9. Mazur P. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes / P. Mazur, K.W. Cole // Cryobiology. – 1985. – Vol. 22, № 6. – P. 509–536.
10. Qu L. Clinical effects of red blood cell storage / L. Qu, D.J. Triulzi // Cancer Control. – 2015. – Vol. 22, № 1. – P. 26–37.
11. Pellerin-Mendes C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier [et al.] // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, № 2. – P. 173–186.
12. Shaklai N. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane / N. Shaklai // Biochemistry. – 1977. – Vol. 16, № 25. – P. 5593–5597.
13. Zhu H. Impaired adenosine-5'-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: a mechanism of hypoxemia after transfusion / H. Zhu, R. Zennadi, B.X. Xu [et al.] // Crit Care Med. – 2011. – Vol. 39, № 11. – P. 2478–2486.

Реферат

ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ, ВІДМИТИХ ПІСЛЯ ШВИДКОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДТАВАННЯ У СЕРЕДОВИЩІ З САХАРОЗОЮ І 1,2-ПРОПАНДІОЛОМ

Рамазанов В.В., Воловельська Є.Л., Ніпот Е.Е., Ершов С.С., Ершова Н.А., Руденко С.В., Бондаренко В.А.

Ключові слова: еритроцити, заморожування, морфологія, АТФ.

Трансфузія еритроцитів після тривалого гіпотермічного зберігання (ГТЗ) не завжди нормалізує гемодинаміку і може призводити до розвитку посттрансфузійного системного запалення. Заморожування і зберігання еритроцитів у рідкому азоті (-196 ° С) дозволить виключити тривале ГТЗ і, можливо, попередити запальний процес. В роботі показано, що заморожування еритроцитів в середовищі, що містить 1,2-ПД (22%), сахарозу (10%) і незначну концентрацію NaCl (0,27%) забезпечує збереження осмотичних і морфологічних характеристик. Крім того, зберігається клітинний АТФ на рівні 77%, який потрібен для здійснення еритроцитами функції регуляції судинного тону. Ефективність комбінованого криоконсерванту, ймовірно, пов'язана з тим, що на стадії заморожування проникний криопротектор (1,2-ПД) протидіє «критичному» стисненню клітин, значний внесок в яке вносить концентрування сахарози. Разом з тим, при відтаванні сахароза запобігає надмірне збільшення обсягу клітин. В сумі відбувається послаблення гіпертонічного і осмотичного стресу на клітини, що обумовлює збереження осмотичних характеристик і АТФ.

Summary

PROPERTY OF RED BLOOD CELLS WASHED AFTER QUICK FREEZING-THAWING IN MEDIUM WITH SUCROSE AND 1,2-PROPANEDIOL

Ramazanov V.V., Volovelskaya E.L., Nipot E.E., Ershov S.S., Ershova N.A., Rudenko S.V., Bondarenko V.A.

Key words: erythrocytes, freezing, morphology, ATP.

Transfusion of red blood cells freeze-preserved for a long period of time does not always result in normal haemodynamics and can cause post-transfusion systemic inflammation. These negative consequences are associated with a decrease in the level of ATP and 2,3-DPG erythrocytes freeze-preserved for long period of time. Massive transfusion of such processed erythrocytes can lead to a fatal outcome associated with the development of post-transfusion systemic inflammation in severe trauma and heart surgery. This inflammation is initiated by iron ions, which are released upon destruction of freeze-preserved erythrocytes in macrophages, followed by stimulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Freezing and storing erythrocytes in liquid nitrogen (-196 ° C) enables to prevent serious side effects, including the development of inflammation. However, even during autotransfusion of erythrocytes after their freezing in a medium with glyc-

erol followed for a short period time (up to 7 days), the post-transfusion value of cell survival within 24 hours is 70-75%. Destruction of erythrocytes after the transfusion is determined by their damage during freezing, according to literature data. The solution of the problem of preventing cell damage during freezing may consist in the development of combined cryo-preserved, containing a significant fraction of the non-penetrating cryoprotectant. It was found out earlier, that the rapid freezing of erythrocytes in a medium containing non-penetrating and penetrating protective components ensures the preservation of cell resistance to the action of osmotic stress during rapid thawing. Moreover, erythrocytes frozen in these media differ slightly in osmotic and morphological characteristics of intact cells. This paper has shown that the freezing of erythrocytes in a medium containing sucrose (10%) and 1,2-propanediol (1,2-PD, 22%) with a low NaCl content (0,27%) ensures the preservation of the osmotic and morphological characteristics of cells. In addition, cellular ATP is maintained at a level of 77% of control that is necessary for the implementation of red blood cells regulation of vascular tone. It can be assumed, the effectiveness of the combined cryo-protectants is due to the fact that in the freezing stage the penetrating cryoprotectant (1,2-PD) counteracts the "critical" cell contraction, a significant contribution to which is made by the concentration of sucrose. At the same time, when thawing sucrose prevents an excessive increase in the volume of cells. In sum, there is weakening of hypertonic and osmotic stress on cells that causes the preservation of osmotic and morphological characteristics.

УДК 616.24-018:577.118:616.379-008.64]-092.9

Теслик Т.П., Понирко А.О.

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН МАКРОЕЛЕМЕНТНОГО СКЛАДУ ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ МОЛОДОГО ВІКУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛОКСАНОВОГО ДІАБЕТУ

Сумський державний університет

В останні роки найбільш досконало та детально приділяється увага вивченню впливу цукрового діабету на серцево-судинну, нервову, сечовидільну і травну системи. А ось патоморфогенетичні зміни при хронічній гіперглікемії органів дихання залишаються маловивченими. В нашому експерименті ми досліджували легеневу тканину молодих щурів обох статей, які перебували в експерименті з 90 до 180 діб. Шматочки правої легені, висушували, проводили їх озоління, потім розчиняли у кислотах та визначали в них вміст макроелементів. Аналізуючи дані за вмістом кальцію, калію, натрію і магнію в легких експериментальних тваринах, і, зіставляючи ці показники з контролем у віковому аспекті, можна стверджувати, що хронічна гіперглікемія посилює недостатність змісту основних макроелементів центрального органу дихальної системи, яка прямо пропорційна термінам дії експериментального алоксанового діабету.

Ключові слова: легені, макроелементи, алоксановий діабет, натрій, калій, кальцій, магній.

Дана робота є фрагментом НДР «Закономірності вікових і конституціональних морфологічних перетворень внутрішніх органів і кісткової системи за умов впливу ендо- і екзогенних чинників і шляхи їх корекції», № держ. реєстрації 0113U001347.

Вступ

За даними огляду літературних джерел, органи дихання досконально вивчені на макро- та мікрорівнях [2;6;8;9]. Але питання впливу патології ендокринної системи на легені вивчена недостатньо.

Загально відомий факт про високий відсоток захворюваності людей на діабет I типу, який проявляється наявністю хронічної гіперглікемії та глюкозурії.

На сьогоднішній день причину цукрового діабету I типу знайти не вдалось, але провідні експерти-діабетологи відносять його до аутоімунних захворювань. Доведено, що у виникненні цього захворювання приймають участь протективні генотипи в поєднанні з факторами навколишнього середовища [1;3;5].

Найбільш досконало та детально приділяється увага вивченню впливу цукрового діабету на серцево-судинну, нервову, сечовидільну, травну систему, а дія хронічної гіперглікемії на органи дихання залишається маловивченою. Що стосу-

ється порушень у хімічному складі, то детальніше всього вивчена кісткова тканина. Існують дані, що пацієнти з цукровим діабетом I типу мають підвищений ризик до патологічних переломів кісток [7]. Цей факт пов'язують з порушенням диференціювання остеобластів, що призводить до їх підвищеної крихкості. Також визначено порушення синтезу колагену та еластину в дослідіах по загоєнню ран [4].

В даній роботі був проведений аналіз хімічного складу легеневої тканини молодих щурів з експериментальним алоксановим діабетом в порівнянні з інтактною групою тварин.

Мета

Виявити зміни макроелементного складу легень за умов алоксанового діабету.

Матеріали та методи дослідження

Досліджували п'ять груп білих лабораторних щурів обох статей віком 5-8 місяців, з них чотири – експериментальні та одна інтактна (табл. 1).