

## Влияние факторов криоконсервирования на иммуногенные свойства эритроцитов

М.А. СИРОУС, К.А. ГОЛЬЦЕВ, И.В. РАССОХА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Cryopreservation Factors on Immunogenic Properties of Erythrocytes

M.A. SIROUS, K.A. GOLTSEV, I.V. RASSOKHA

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

Модификация структуры клеточной мембраны эритроцитов и освобождение скрытых антигенных эпитопов приводят к изменению их иммуногенных характеристик, что может сопровождаться формированием аутоантител и быть причиной развития аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА). Модификация антигенного (иммуногенного) спектра эритроцитов можно добиться воздействием различных физических факторов, например прогреванием, которое используется в экспериментальных исследованиях при индукции АИГА. Интересным представляется изучение вопроса о подобном рода перестройках эритроцитов после их криоконсервирования.

Цель работы – изучить влияние различных режимов криоконсервирования на иммуногенные характеристики эритроцитов мышей в системе *in vivo*.

Мышей линии C57Bl/6J разделили на шесть групп, которым однократно внутрибрюшинно в количестве  $3 \times 10^9$  клеток /на мышью вводили: 1-й группе – нативные сингенные эритроциты; 2-й – сингенные эритроциты, прогретые при температуре 49,5°C; 3-й – эритроциты, криоконсервированные под защитой 30% ПЭО-1500 без отмывки от криопротектора после размораживания; 4-й – эритроциты, криоконсервированные под защитой 30% глицерина с 3-кратной отмывкой от криопротектора после размораживания; 5- и 6-й – сингенные эритроциты, которые только экспонировали с криопротекторами. Эритромассу объемом 1,8 мл замораживали в полиэтиленовых ампулах Nunc до температуры –196°C путем быстрого погружения в жидкий азот. Оттаивание производили на водяной бане при температуре 42–44°C. Контроль за образованием противэритроцитарных аутоантител (ААТ) с помощью прямой реакции Кумбса осуществляли на 13-е сутки после введения эритроцитов. Показатель потенциала иммуногенности эритроцитов (ПИЭ) использовали для сравнения обобщенного эффекта модификации иммуногенности эритроцитов в разных группах.

Установлено, что максимально выраженный иммунный ответ на сингенные эритроциты в виде продукции ААТ наблюдался после их тепловой обработки при 49,5°C. Эритроциты, криоконсервированные с 30%-м глицерином и с ПЭО-1500, обладали менее выраженными иммуногенными свойствами, однако и они индуцировали развитие аутоиммунной реакции примерно у 50% мышей-реципиентов.

Полученные результаты свидетельствуют о появлении иммуногенных свойств у сингенных эритроцитов после криоконсервирования. Возможно, что модификация мембранных структур эритроцитов является следствием реализации эффекта замораживания-отогрева, поскольку влияние на этот процесс криопротекторов “в чистом виде” не отмечалось.

Modification of structure of erythrocyte cell membrane and release of latent antigen epitopes results in the alteration of their immunogenic characteristics that may be accompanied with the formation of autoantibodies and be the cause of the development of autoimmune hemolytic anemia (AIHA). Modification of antigenic (immunogenic) spectrum of erythrocytes may be achieved by the effect of different physical factors, e.g. heating, used in experimental studies to induce AIHA. The study of the question about similar re-arrangements of erythrocytes after their cryopreservation is interesting.

The research aim was studying the effect of different regimens of cryopreservation on immunogenic characteristics of mice erythrocytes *in vivo*.

The C57Bl/6J mice were divided into 6 groups, which were injected intraperitoneally once in a dose of  $3 \times 10^9$  cells/per mouse: to the 1<sup>st</sup> group native syngeneic erythrocytes, to the 2<sup>nd</sup> one syngeneic erythrocytes, heated at 49.5°C; to the 3<sup>rd</sup> one erythrocytes, cryopreserved under 30% PEO-1500 protection with no washing-out of cryoprotectant after thawing; to the 4<sup>th</sup> one erythrocytes, cryopreserved under 30% glycerol protection with three-fold washing-out from cryoprotectants after thawing, to the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> ones syngeneic erythrocytes only exposed to cryoprotectants. The erythromass of 1.8 ml volume was frozen in Nunc polyethylene ampoules down to –196°C by rapid immersion into liquid nitrogen. Thawing was performed on water bath at 42–44°C. The formation of anti-erythrocyte autoantibodies (AAB) using direct Coombs reaction was controlled to the 13<sup>th</sup> day after introduction of erythrocytes. The erythrocyte immunogenicity potential index (IPI) was used to compare total effect of modification of immunogenicity of erythrocytes in different groups.

It has been established that maximum manifested immune response to syngeneic erythrocytes as AAB production was observed after their heat treatment at 49.5°C. Erythrocytes cryopreserved with 30% glycerol and PEO-1500 had less manifested immunogenic properties, however they induced the development of autoimmune reaction approximately in 50% recipient mice.

The obtained results testify to the appearance of immunogenic properties in syngeneic erythrocytes after cryopreservation. Probably, the modification of membrane structures of erythrocytes is likely the consequence of realization of the effect of freeze-thawing, since the influence on this process of only cryoprotectants was not found.