

## КОАГУЛЯЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В КОМБИНИРОВАННЫХ СРЕДАХ С НЕПРОНИКАЮЩИМИ И ПРОНИКАЮЩИМИ КРИОПРОТЕКТОРАМИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

(г. Харьков)

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

**Вступление.** Разработка трансфузионных протоколов с учетом гемостатического потенциала крови различных категорий пациентов при различных заболеваниях всегда остается актуальной и не всегда решаемой проблемой [4]. В связи с этим, учет и модификация коагулянтных свойств клеток крови перед трансфузией может оказаться эффективным подходом для их направленного влияния на общий гемостаз и, соответственно, их эффективно-го функционирования при циркуляции крови.

Эритроциты включают внутриэритроцитарные и внеэритроцитарные гемостатические факторы, связанные с определенными структурами клетки. Внутриэритроцитарные факторы: тромбопластин, антигепарин, АС-глобулин, тромбиноподобный фактор, фибринстабилизирующий фактор, АДФ, фактор ретракции сгустка крови, ингибиторы фибринолиза. Внеэритроцитарные факторы: фибриноген эритроцитов, антитромбины, факторы фибринолиза [3].

Можно предположить, что при замораживании эритроцитов в присутствии различных защитных компонентов будет происходить мобилизация отдельных факторов и изменяться коагуляционный потенциал клетки в сторону большей или меньшей выраженности.

**Цель работы** – исследовать влияние замораживания эритроцитов в комбинированных средах с непроникающими и проникающими криопротекторами на их способность изменять время коагуляции плазмы крови.

**Объект и методы исследования.** В работе использовали донорскую кровь человека. Плазму получали в результате двухразового центрифугирования при 1500 об./мин. в течение 10 мин. Эритроциты отмывали трехразовым центрифугированием при 3000 об./мин в течение 5 мин.

Полученные эритроциты замораживали в разных средах, содержащих 20% декстран (35000) + 5%

диметилсульфоксид (ДМСО), который готовили на сахарозо-солевой среде (6,85% сахара + 0,3% NaCl), 20% полиэтиленгликоль (ПЭГ-1500) + 15% ДМСО или 20% ПЭГ-1500 + 15% 1,2-пропандиол (1,2-ПД) – готовили на 0,9% NaCl. После отогрева (40°C) размороженную суспензию медленно, с перемешиванием, разводили теплым (37°C) физиологическим раствором NaCl (0,9%) в 10 раз и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Данную процедуру повторяли ещё один раз. Затем, без учета скорости разведения осадка эритроцитов, клетки дополнительно 1 раз отмывали физиологическим раствором NaCl (0,9%) при 37°C.

Отмытые эритроциты разводили в 4 раза 0,9%-м NaCl или водой для получения гемолизата. Полученные суспензии комбинировали с плазмой по методике определения времени рекальцификации плазмы. В пробирку, установленную на водяной бане при 37°C, наливают 0,2 мл 0,28% раствора CaCl<sub>2</sub>, 0,1 мл 0,9% NaCl (или 0,1 мл H<sub>2</sub>O в эксперименте с гемолизатом) и 50 мкл суспензии эритроцитов, разведенной 0,9% NaCl (или H<sub>2</sub>O в эксперименте с гемолизатом). Через 60 сек в пробирку вносят 0,1 мл исследуемой плазмы и включают секундомер, фиксируя время свертывания плазмы.

Для исследования агрегации эритроцитов использовали спектрофотометр (СФ-4А), сопряженный с самописцем (регистрация изменения уровня оптической плотности клеточных суспензий при длине волны 720 нм). Оптическая плотность суспензии эритроцитов в экспериментах была 0,3-0,33 единиц, что соответствовало гематокриту 0,02% (~3,0·10<sup>6</sup> кл./мл). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Гипотонический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 ммоль/л трис-буфер с рН 7,4 и NaCl с различной концентрацией (0,09-0,9%). Клетки в среде объемом 1мл и с гематокритом 0,6% инкубировали 15 мин при 25°C, далее центрифугировали при 3000 об./мин в течение 3 мин и определяли степень гемолиза.

**Результаты исследований и их обсуждение.** После замораживания-отогрева эритроцитов в среде, содержащей декстран(20%) + ДМСО(5%) и отмывании клеток от криоконсерванта потери по гемолизу составляли  $8 \pm 2\%$ ; для среды ПЭГ-1500(20%) + ДМСО(15%) –  $6 \pm 1,5\%$ ; для среды ПЭГ-1500(20%) + 1,2-ПД(15%) –  $7 \pm 2\%$ .

Время коагуляции плазмы в присутствии интактных эритроцитов составляет 185 сек, в присутствии гемолизата происходит ускорение до 125 сек (рис. 1, столбики 1). Замораживание эритроцитов, независимо от состава криоконсерванта, приводит к повышению активности клеток и их гемолизатов и ускорению коагуляции (рис. 1, столбики 2,3,4).

Полученные результаты указывают на то, что при замораживании-отогреве-отмывании эритроцитов происходит модификация мембран и, возможно, цитоплазмы клеток с последующей активацией факторов, которые ускоряют свертывание плазмы.

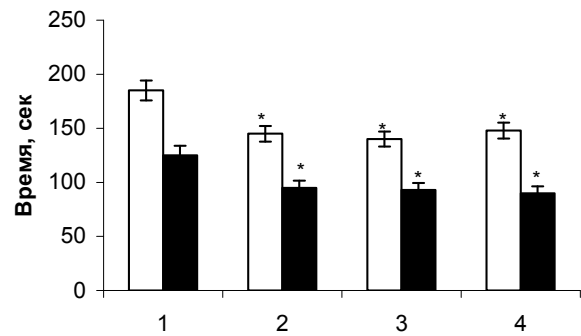
Исследование агрегации эритроцитов, индуцированной катионами  $La^{3+}$ , не выявило различий между замороженными и интактными эритроцитами (рис. 2). Результаты указывают на то, что коагуляционная активность эритроцитов не связана с их агрегационной способностью при индукции катионами  $La^{3+}$ .

Исследование гипотонического гемолиза замороженных эритроцитов не выявляет значительного изменения осмотической хрупкости по сравнению с интактными клетками (рис. 3). Поэтому можно сказать, что модификация коагулянтных свойств мембран при замораживании не изменяет осмотических свойств эритроцитов.

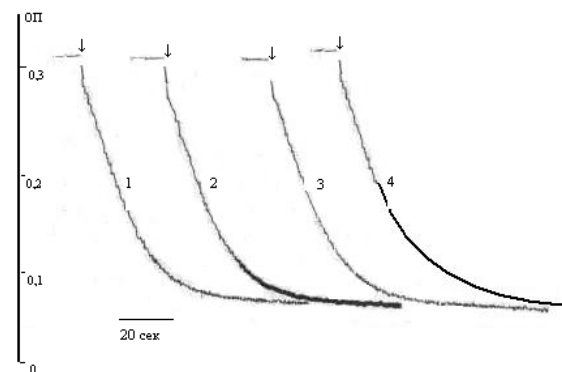
Согласно клеточной модели свертывания крови очень важную роль в процессах гемостаза играют клетки (тромбоциты, эритроциты, фибробласты и др.), на поверхности которых происходят различные реакции, в том числе образование тромбина из его неактивного предшественника протромбина под действием тромбиназы [5]. Протромбиназа активируется на поверхности клеток в присутствии катионов  $Ca^{2+}$ , фосфатидилсерина и факторов V и X. Фосфатидилсерин локализован на внутренней поверхности клеточных мембран и переход его на внешнюю поверхность контролируется специфическими механизмами [6].

Эритроциты включают внутриэритроцитарные и внеэритроцитарные гемостатические факторы, связанные с определенными структурами клетки. [3]. Известно, что при переливании замороженных эритроцитов происходит неизбежный частичный гемолиз эритроцитов и выход в кровяное русло эритроцитарных факторов свертывания крови: АДФ, тромбопластического фактора эритроцитов и других, а также антикоагулянтов [1]. Гемолиз эритроцитов приводит к экспонированию фосфатидилсериновых молекул во внешнюю среду и к контакту их с факторами свертывания, что вызывает дополнительную активацию протромбиназы.

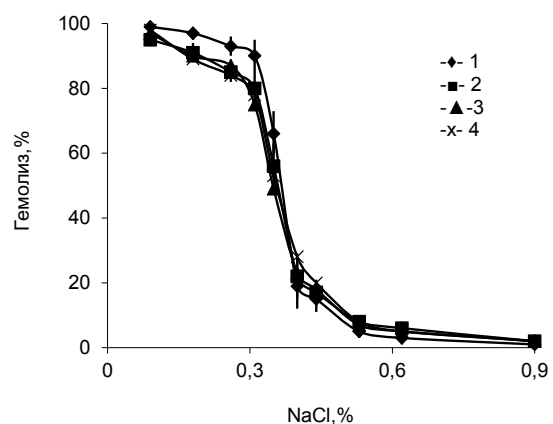
Установлено, что тромбопластический фактор эритроцитов качественно не отличается от такового



**Рис. 1.** Время коагуляции плазмы в присутствии эритроцитов ( $\square$  –  $3,0 \times 10^8$  кл/мл) и их гемолизатов ( $\blacksquare$ ). 1 – интактные эритроциты, 2 – эритроциты заморожены в среде с декстраном(20%) + ДМСО(5%), 3 – эритроциты заморожены в среде с ПЭГ-1500(20%) + ДМСО(15%), 4 – эритроциты заморожены в среде с ПЭГ-1500(20%) + 1,2ПД(15%). \* – статистически достоверно по сравнению с интактными эритроцитами ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 2.** Изменение оптической плотности (ОП) при агрегации эритроцитов, индуцированной введением в кювету 80 мкМ  $La^{3+}$ , в момент, обозначенный стрелкой. 1 – интактные эритроциты, 2 – эритроциты заморожены в среде с декстраном(20%) + ДМСО(5%), 3 – эритроциты заморожены в среде с ПЭГ-1500(20%) + ДМСО(15%), 4 – эритроциты заморожены в среде с ПЭГ-1500(20%) + 1,2ПД(15%).



**Рис. 3.** Зависимость гемолиза от концентрации NaCl для эритроцитов, отмываемых после замораживания в средах: 2 – Д-35000(20%) + ДМСО(5%), 3 – ПЭГ-1500(20%) + ДМСО(15%), 4 – ПЭГ-1500(20%) + 1,2-ПД(15%), 1 – интактные клетки.

тромбоцитів. Гемолизованні еритроцити по порівнянню з цільними клітками мають більшу тромбопластичну активність. Раніше пропонувалося використовувати препарати мембран еритроцитів для корекції гемостаза у хворих гіпокоагуляцією. Однак цей підхід не знайшов практичного застосування, так як існуючий осмотичний метод одержання еритроцитарних мембран, заснований на гемолизі еритроцитів 100-кратним об'ємом дистильованої води, пошкоджує їх оболонки [2].

Таким чином, при заморожуванні-охлажденні еритроцитів в комбінованих середовищах з проникливими і непроникливими криопротекторами і отмыванні не змінюється їх агрегаційна здатність, зберігається їх осмотична стійкість і, ймовірно, відбувається активація клітинних факторів згортання крові, в результаті чого відбувається зменшення часу коагуляції плазми під впливом заморожених кліток і їх гемолизатів. В перспективі застосування заморожених

еритроцитів дозволить розробити гемостатичні клітинні препарати з метою застосування їх в клінічній практиці для посилення згортуючої активності крові.

### Висновки.

1. Заморожування еритроцитів в комбінованих середовищах з непроникливими і проникливими криопротекторами не викликає змін агрегації індукційованої катіонами  $La^{3+}$  по порівнянню з інтактними клітками.

2. Заморожені еритроцити або їх гемолизати, по порівнянню з інтактними клітками, в більшій ступені прискорюють коагуляцію плазми.

3. Еритроцити, заморожені в комбінованих середовищах, незначительно відрізняються по осмотичній крихкості від інтактних кліток.

### Перспективи дальніших досліджень.

В наступній роботі планується дослідити коагуляційну активність еритроцитів, заморожених в криоконсерванті з модифікаторами мембран.

## Література

1. Аграненко В. А. Заморожена кров і її клінічне застосування / В. А. Аграненко, Л. І. Федорова. – М.: Медицина, 1983. – 96 с.
2. Григорьев Г. И. Способ атравматического деплазмирования эритроцитов с целью получения их оболочек, способных выполнять гемостатическую функцию тромбоцитов / Г. И. Григорьев // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – №7. – С. 18-21.
3. Основы клинической гематологии. Справочное пособие / Под ред. Радченко В. Г. – СПб.: Диалект, 2003. – 304 с.
4. Bosman G. J. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion / G. J. Bosman // Transfus. Med. – 2008. – Vol. 18, №6. – P. 335-347.
5. Hoffman M. A cell-based model of hemostasis / M. Hoffman, D. M. Monroe // Thromb Haemost. – 2001. – Vol. 85, №6. – P. 958-965.
6. Sims P. J. Unraveling the Mysteries of Phospholipid Scrambling / P. J. Sims, T. Wiedmer // Thromb Haemost. – 2001 – Vol. 86 – P. 266-275.

УДК 57. 043: 547. 422: 612. 115

### КОАГУЛЯЦІЙНА АКТИВНІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ, ЩО ЗАМОРОЖУВАЛИ У КОМБІНОВАНИХ СЕРЕДОВИЩАХ З НЕПРОНИКАЮЧИМИ ТА ПРОНИКАЮЧИМИ КРИОПРОТЕКТОРАМИ

Рамазанов В. В., Воловельська Є. Л., Коптелов В. О., Бондаренко В. А.

**Резюме.** Досліджували агрегацію еритроцитів, що заморожували у комбінованих середовищах з непроникливими та проникливими криопротекторами та їх вплив на час коагуляції плазми крові.

Показано, що агрегаційна здатність заморожених еритроцитів не відрізняється від такої інтактних клітин. Встановлено, що заморожені еритроцити або їх гемолизати, у порівнянні з інтактними клітинами, в більшій ступені прискорюють коагуляцію плазми. Еритроцити, які заморожені у комбінованих середовищах, незначно відрізняються за осмотичною крихкістю від інтактних клітин.

Отримані результати дозволяють припустити, що при заморожуванні еритроцитів відбувається модифікація мембрани і, можливо, активація клітинних факторів згортання крові при збереженні осмотичної стійкості клітин. В результаті цього відбувається зменшення часу коагуляції плазми під впливом заморожених еритроцитів та їх гемолизатів.

**Ключові слова:** еритроцити, заморожування, комбіновані криоконсерванти, агрегація, коагуляція.

УДК 57. 043: 547. 422: 612. 115

### КОАГУЛЯЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В КОМБИНИРОВАННЫХ СРЕДАХ С НЕПРОНИКАЮЩИМИ И ПРОНИКАЮЩИМИ КРИОПРОТЕКТОРАМИ

Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Коптелов В. А., Бондаренко В. А.

**Резюме.** Исследовали агрегацию эритроцитов, замороженных в комбинированных средах с непроникливыми и проникающими криопротекторами, и их влияние на время коагуляции плазмы крови.

Показано, что агрегационная способность замороженных эритроцитов не отличается от таковой интактных клеток. Установлено, что замороженные эритроциты или их гемолизаты, по сравнению с интактными

клетками, в большей степени ускоряют коагуляцию плазмы. Эритроциты, замороженные в комбинированных средах, незначительно отличаются по осмотической хрупкости от интактных клеток.

Полученные результаты позволяют предположить, что при замораживании эритроцитов происходит модификация мембраны и возможно активация клеточных факторов свертывания крови при сохранении осмотической устойчивости клеток. В результате этого происходит уменьшение времени коагуляции плазмы под действием замороженных эритроцитов и их гемолизатов.

**Ключевые слова:** эритроциты, замораживание, комбинированные криоконсерванты, агрегация, коагуляция.

UDC 57. 043: 547. 422: 612. 115

### **Coagulation Activity of Erythrocytes, Frozen in Combined Media with Non-Penetrative and Penetrative Cryoprotectants**

**Ramazanov V. V., Volovelskaya E. L., Koptelov V. A., Bondarenko V. A.**

**Abstract.** Erythrocytes comprise intra-erythrocyte and extra-erythrocyte hemostatic factors related with certain cell structures. Intra-erythrocyte factors are thromboplastin, antiheparin, AC-globulin, thrombin-similar factors, fibrin-stabilizing factor, ADP, factor of blood clot retraction, fibrinolysis inhibitors. Extra-erythrocyte factors: erythrocyte fibrinogen, antithrombines, fibrinolysis factors.

It is known that during transfusion of frozen erythrocytes an inevitable partial hemolysis of erythrocytes and release of erythrocyte factors of blood coagulation: ADP, thromboplastic factor of erythrocytes and other as well as anti-coagulants into a blood channel occurs. Hemolysis of erythrocytes leads to exposure of phosphatidylserine molecules of membrane inner surface to the contact with coagulation factors, which causes an additional activation of prothrombinase.

Hemolized erythrocytes if compared with the whole cells possess higher thromboplastic activity. Previously it has been proposed to use the preparations of erythrocyte membranes to correct hemostasis of the patients with hypocoagulation, however this approach has not found any application in practice, since existing osmotic method for obtaining erythrocyte membranes based on hemolysis of erythrocytes with 100-fold volume of distilled water is technically complicated and damages the cell membranes.

We may assume that when freezing erythrocytes in presence of different protective components the mobilization of certain factors will occur and the cell coagulation potential will change towards higher or lower manifestation rate.

The aggregation of erythrocytes, frozen in combined media with non-penetrative and penetrative cryoprotectants and their effect on blood plasma coagulation time were studied in this research.

The aggregation ability of frozen erythrocytes was shown as not different from the one in the intact cells. Frozen erythrocytes or their hemolysates were established to accelerate the plasma coagulation in a greater extent than the intact cells. The erythrocytes frozen in combined media were slightly different by osmotic fragility from the intact cells.

Our findings enable suggesting the fact that when freezing erythrocytes the membrane modification and a possible activation of cell factors of blood clotting occur with keeping a cell osmotic resistance, resulting in reduced plasma coagulation time under the effect of frozen erythrocytes and their hemolysates.

In prospect the application of frozen erythrocytes will enable designing hemostatic cell preparations in order to use them in clinical practice for strengthening blood clotting activity.

**Keywords:** erythrocytes, freezing, combined cryopreservatives, aggregation, coagulation.

*Рецензент – проф. Костенко В. О.*

*Стаття надійшла 10. 09. 2014 р.*