

УДК 57.043:612.111

Денисова О.М., Жегунов Г.Ф., Хасбауі Х.А., Ващенко В.В. ©

*Харківська державна зооветеринарна академія***ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ КОМБІНОВАНИХ  
СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ БИКА**

*Досліджували збереженість еритроцитів бика після кріоконсервування під захистом комбінованих кріоконсервантів, до складу яких входять проникаючі (ДМСО та 1,2-пропандіол) та непроникаючий (ПЕО-1500) кріопротектори. Комбінування проникаючих кріопротекторів з полімерами сприяє підвищенню кріопротекторної ефективності.*

**Ключові слова:** кріоконсервування, еритроцити бика, кріопротектор

Зараз існують методи кріоконсервування клітин крові людини, що дозволяють зберігати її протягом тривалого часу. Є численні роботи з вивчення ефективності різних способів заморожування-відігріву й впливу кріопротекторів на збереженість еритроцитів людини. Розширення діапазону досліджень механізмів стабілізації клітин, охоплюючи еритроцити інших ссавців, які характеризуються певними особливостями структури, дозволяє дослідникам більш чітко виявити загальні принципи організації клітин, спрямовані на підвищення стійкості до несприятливих факторів. Зокрема, еритроцити коня, бика й собаки, маючи видові особливості в організації мембранно-цитоскелетного комплексу й регуляції іонного гомеостазу, становлять значний інтерес для виявлення загальних закономірностей реакції клітин на стресові фактори процесу кріоконсервування.

Крім загальнобіологічного значення дослідження поведінки еритроцитів різних тварин в умовах низьких температур, виникають передумови для розробки методів кріоконсервування крові тварин для використання у ветеринарній медицині.

Переливання крові здавна вважається високоефективним методом інтенсивної терапії. Перелита кров, крім загальновідомих функцій: замісної, імуностимулюючої, оксигенуючої, поживної, виконує й своєрідну буферну функцію. Еритроцити здатні пасивно адсорбувати на своїй поверхні велику кількість антигенів, таких як бактеріальні полісахариди, токсини або віруси. При такій адсорбції не відбувається інактивація вірусів, але спостерігається значне зниження інтоксикації. У важких випадках врятувати тварину можна, тільки використовуючи гемотрансфузію. При застосуванні переливання існує проблема стерильності крові донора, тому що гарантія того, що донор не є носієм якого-небудь інфекційного агента, як правило, відсутня. Тому виникає необхідність створення банків крові донорів. У такий спосіб гемотрансфузія кріоконсервованих еритроцитів може значною мірою полегшити лікування при

деяких інфекційних, інвазійних захворюваннях, а також при отруєннях і значних крововтратах.

Розкриття механізмів криозахисту й крипошкодження еритроцитів тварин дозволить розробити низькотемпературні технології зберігання клітин і створити банк крові тварин. Створення таких банків дасть можливість завжди мати запас рідкісних груп крові тварин.

Останнім часом активно розробляються нові методи створення ефективних криозахисних середовищ для низькотемпературного зберігання різних клітин та тканин. Одним з них є використання комбінацій двох та більше криопротекторів. Використання таких криоконсервантів приводить до отримання високих результатів криоконсервування ствольних клітин периферичної крові та кісткового мозку людини [4, 7], гемопоетичних клітин кордової крові [5], еритроцитів людини [2].

Мета роботи – вивчення збереженості еритроцитів бика після низькотемпературної консервації (-196 °С у рідкому азоті) під захистом комбінованих криоконсервантів.

**Матеріали і методи.** Матеріалом дослідження були еритроцити бика. Всі тварини були здоровими, статевозрілими самцями. Тварини були імунізовані, вільні від паразитів. Кров бика (віком 2-4-х років) забирали з яремної вени. Дослідження проводили згідно з «Загальними принципами дослідження на тваринах», що були одобрені III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) та узгодженні з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (Страсбург, 1985 р.).

Кров заготовляли на глюкозо-цитратному консерванті і зберігали до криоконсервування не більше 48 годин при 4 °С. Еритроцити перед проведенням експерименту центрифугували при 350 g і тричі промивали ізотонічним сольовим розчином (150 mM NaCl, 5 mM фосфатний буфер, pH 7.4).

Для криоконсервування використовували комбіновані криопротектори, до складу яких входили диметилсульфоксид (ДМСО), 1,2-пропандіол (1,2-ПД), поліетиленоксид м.м. 1500 (ПЕО-1500). Розчини криопротекторів в концентраціях 5 – 30 % готували на сахарозно-сольовому середовищі (50 mM NaCl + 200 mM сахарози + 5 mM фосфатний буфер, pH 7,4) або сольовому середовищі (150mM NaCl + 5 mM фосфатний буфер, pH 7,4).

Розчин криопротектору додавали до клітинної суспензії при кімнатній температурі у співвідношенні 1:1 (по об'єму) по краплям зі швидкістю приблизно 10 мл за хвилину. Криоконсервування проводили у поліетиленових контейнерах об'ємом 10 мл. Заморожування здійснювали до температури (-196 °С) шляхом швидкого занурення контейнеру у рідкий азот. Відігрів клітинної суспензії здійснювали на водяній бані при температурі 42-44 °С з постійним коливанням контейнеру до повного відігріву.

Криопротектор видаляли серійним центрифугуванням при 350 g [3]. На першому етапі до криоконсервованих еритроцитів додавали рівний об'єм гіпертонічного сольового розчину (600 mM NaCl, 5mM фосфатний буфер, pH

7,4). Після чого еритроцити двічі промивали ізотонічним сольовим розчином (150 мМ NaCl, 5мМ фосфатний буфер, рН 7,4) .

Рівень гемолізу розраховували після спектрофотометричного визначення кількості гемоглобіну в супернатанті, вимірюючи оптичну густина при 543 нм [6]:

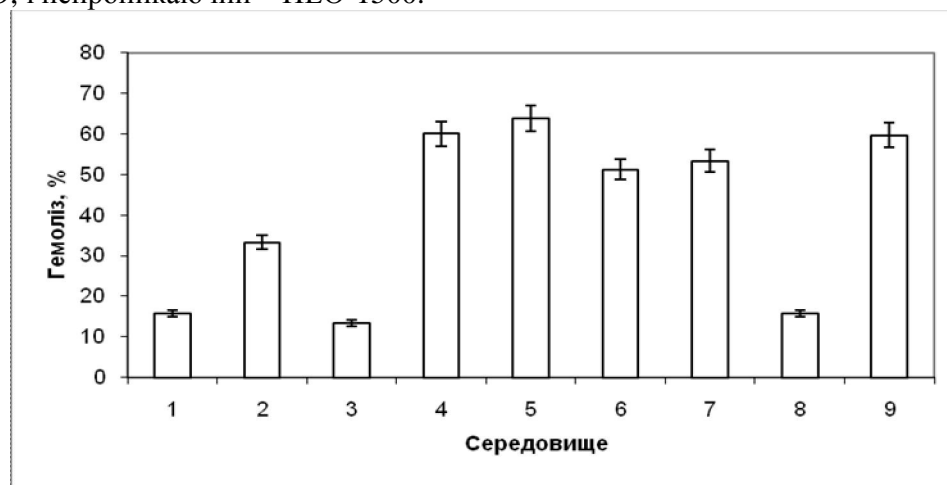
$$\% \text{ гемолізу} = [A_1 / A_2] \times 100 \%,$$

де,  $A_1$  – оптична густина супернатанту досліджуваної проби;

$A_2$  – оптична густина при повному гемолізі контрольної проби.

Статистичну обробку даних проводили параметричним методом з використанням критерію знаків [1]. Для розрахунків використовували комп'ютерну програму "Stat Graphics". Кількість експериментів у кожній серії дослідів була не менше п'яти.

**Результати і обговорення.** Комбінування у середовищі заморожування непроникаючих кріопротекторів з проникаючими дозволяє зменшити їх концентрацію без зміни збереженості та осмотичної стійкості заморожених клітин. Тому були використані проникаючі кріопротектори – пропандіол-1,2 та ДМСО, і непроникаючий – ПЕО-1500.

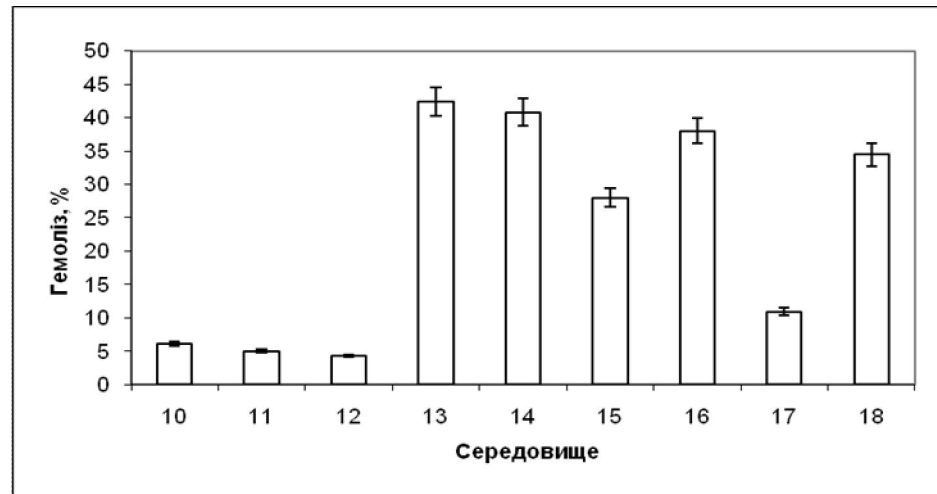


**Рис. 1.** Збереженість еритроцитів бика після кріоконсервування з проникаючими і непроникаючим кріопротекторами у сольовому середовищі (150 мМ NaCl+10мМ фосфатний буфер, рН 7,4). Середовища містять: 1 – 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2; 2 – 5% ДМСО+15% пропандіол-1,2; 3 – 15% пропандіол-1,2+5% ДМСО; 4 – 10% ПЕО-1500+10% пропандіол-1,2; 5 – 5% ПЕО-1500+5% пропандіол-1,2; 6 – 5% ПЕО-1500+15% пропандіол-1,2; 7 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 8 – 5% ПЕО-1500+ 15% ДМСО; 9 – 15% ПЕО-1500+5% ДМСО.

Бачимо, що більша збереженість клітин спостерігається при кріоконсервуванні еритроцитів з кріоконсервантами, в склад яких входять 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2, 15% пропандіол-1,2+5% ДМСО та 5% ПЕО-1500+

15% ДМСО (рис.1). При додаванні в середовище сахарози (рис.2) спостерігається зниження рівня пошкодження клітин на 10 %.

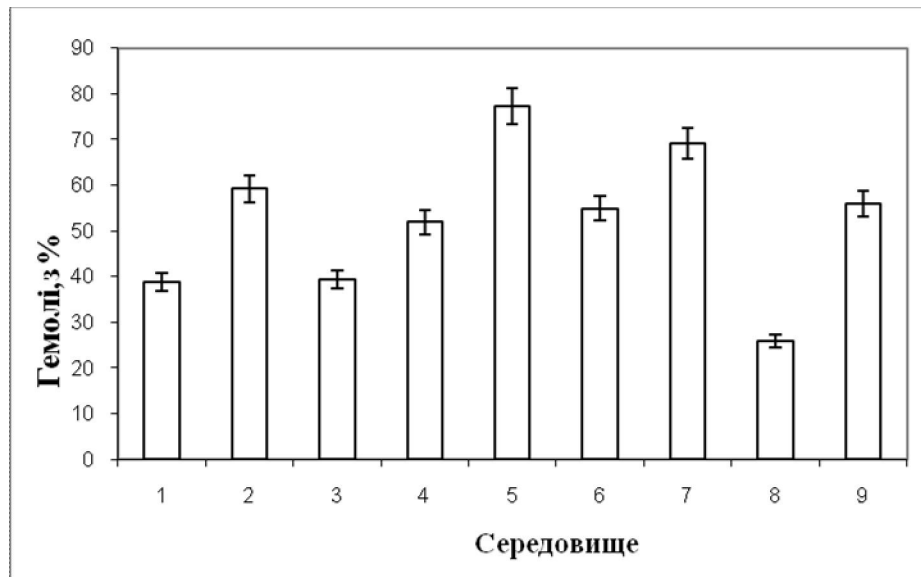
Найкраща збереженість клітин була видмычена при використанні суміші кріопротекторів, що містять ДМСО+пропандіол-1,2.



**Рис. 2.** Збереженість еритроцитів бика після кріоконсервування з проникаючими і непроникаючим кріопротекторами у сахарозно-сольовому середовищі (200 mM сахарози + 50 mM NaCl + 10mM фосфатний буфер, pH 7,4). Середовища містять: 10 – 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2; 11 – 5% ДМСО+15% пропандіол-1,2; 12 – 15% пропандіол-1,2;+5% ДМСО; 13 – 10% ПЕО-1500+10% пропандіол-1,2; 14 – 15% ПЕО-1500+5% пропандіол-1,2; 15 – 5% ПЕО-1500+15% пропандіол-1,2; 16 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 17 – 5% ПЕО-1500+ 15% ДМСО; 18 – 15% ПЕО-1500+5% ДМСО.

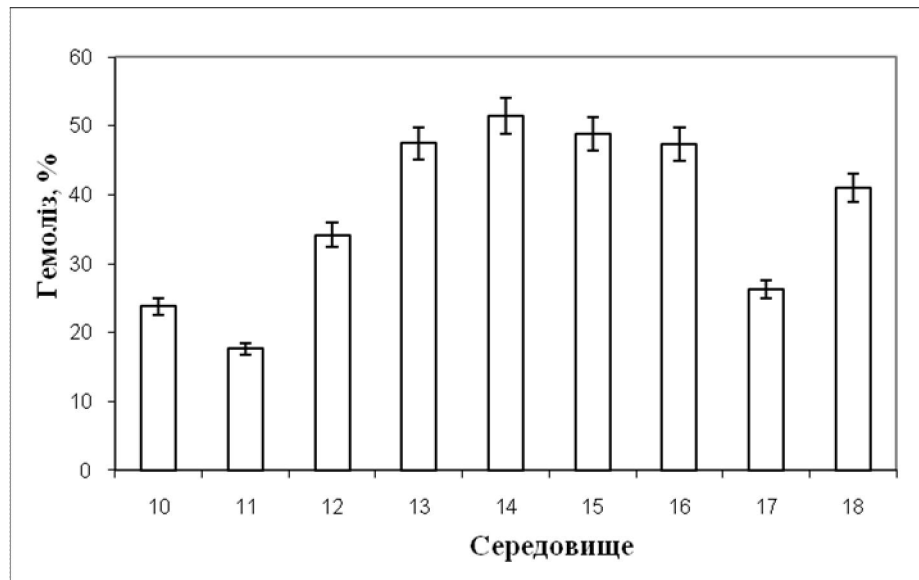
Відомо, що проникаючі кріопротектори необхідно видаляти із клітин перед трансфузією для попередження осмотичного лізису. Видалення кріопротектору з еритроцитів шляхом трикратного відмивання сольовим середовищем з поступовим зниженням концентрації солі призводить до збільшення рівня пошкодження еритроцитів у всіх варіантах.

При кріоконсервуванні еритроцитів під впливом сольового середовища (рис. 3) задовільний рівень збереженості клітин досягається при використанні 5% ПЕО-1500+15% ДМСО (гемоліз  $25,9\% \pm 0,5\%$ ). Інші кріоконсерванти менш ефективні.



**Рис. 3.** Збереженість еритроцитів бика після заморожування-відігріву та відмивання кріопротектору, що були кріоконсервовані під захистом кріоконсервантів у сольовому середовищі (150 mM NaCl + 10mM фосфатний буфер, pH 7,4): 1 – 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2; 2 – 5% ДМСО+15% пропандіол-1,2; 3 – 15% пропандіол-1,2;+5% ДМСО; 4 – 10% ПЕО-1500+10% пропандіол-1,2; 5 – 15% ПЕО-1500+5% пропандіол-1,2; 6 – 5% ПЕО-1500+15% пропандіол-1,2; 7 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 8 – 5% ПЕО-1500+ 15% ДМСО; 9 – 15% ПЕО-1500+5% ДМСО.

Коли для приготування кріоконсервантів використовували сахарозно-сольове середовище, то еритроцити після кріоконсервування та відмивання кріопротектору зберігалися значно краще (рис. 4). Низький рівень пошкодження спостерігається при використанні у якості кріопротекторів суміші 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2, 5% ДМСО+15% пропандіол-1,2, а також 5% ПЕО-1500+15% ДМСО.



**Рис. 4.** Збереженість еритроцитів бика після заморожування-відігріву та відмивання кріопротектору, що були кріоконсервовані під захистом кріоконсервантів у сахарозно-сольовому середовищі (200 mM сахарози + 50 mM NaCl + 10mM фосфатний буфер, рН 7,4): 10 – 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2; 11 – 5% ДМСО+15% пропандіол-1,2; 12 – 15% пропандіол-1,2;+5% ДМСО; 13 – 10% ПЕО-1500+10% пропандіол-1,2; 14 – 15% ПЕО-1500+5% пропандіол-1,2; 15 – 5% ПЕО-1500+15% пропандіол-1,2; 16 – 10% ПЕО-1500+10% ДМСО; 17 – 5% ПЕО-1500+ 15% ДМСО; 18 – 15% ПЕО-1500+5% ДМСО.

Пояснити ефективність комбінованих кріопротекторів можливо з відомих даних про механізми дії проникаючих та непроникаючих кріопротекторів. Непроникаючі кріопротектори знижують температуру замерзання розчину, однак, виникає значна дегідратація клітин та досягнення ними мінімального об'єму. Проникаючі кріопротектори потрапляють до клітин та знижують їх дегідратацію. Але це призводить до ризику утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду. Таким чином, дія окремо проникаючих чи непроникаючих кріопротекторів знижується негативними ефектами. Одним з підходів вирішення цієї проблеми є включення в середовище з непроникаючим кріопротектором проникаючого.

**Висновки.** Виходячи з даних про рівень гемолізу після кріоконсервування та відмивання кріопротектору можна зробити висновок, що найбільш якісний рівень захисту еритроцитів від факторів низькотемпературного консервування надають кріопротектори, що містять:

- 10% ДМСО+10% пропандіол-1,2+200 mM сахарози+50 mM NaCl+5 mM фосфатний буфер;
- 5% ДМСО+15% пропандіол-1,2+200 mM сахарози+50 mM NaCl+5 mM фосфатний буфер;

- 15% ДМСО+5% ПЕО-1500+200 мМ сахарози+50 мМ NaCl+5 мМ фосфатний буфер.

Таким чином, можливо сказати про відносну ефективність використання комбінованих криопротекторів. Вони забезпечують оптимальну дегідратацію клітин, що забезпечує їх стійкість до осмотичних дій.

**Перспективи подальших досліджень.** Збереженість еритроцитів після розморожування недостатній параметр для визначення життєздатності клітин. Тому, планується провести оцінку деконсервованих клітин на можливість їх функціонування в руслі крові після впливу факторів низькотемпературного впливу.

### Література

1. Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: Мир, 1963. – 71 с.
2. Рамазанов В.В. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроницающими и проникающими криопротекторами / В. В. Рамазанов, В.А. Бондаренко. – Проблемы криобиологии, 2010. – Т.20, №1. – С. 47-57.
3. Семенова Н.В. Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания / Н.В. Семенова, Л.И. Федорова, В.Л. Виноградов и др// Гематология и трансфузиол.- 1986. - № 10. - С. 42-52.
4. Clapissou G. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone / G. Clapissou, C. Salinas, P. Malacher et al. // Bull Cancer. – 2004. – Vol.91(4). – P. 97-102.
5. Liu K.Y. Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells / K.Y. Liu, W.C. Dong, Y.L. Wang et al. // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2004. – Vol.12(5). – P.670-673.
6. Mazur P. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 M solutions at 0 or 20 degrees C / P. Mazur, Miller R.H. // Cryobiology. – 1976. – Vol.13(5). – P.507-522.
7. Rowley S. D. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch / S.D. Rowley, Z. Feng, L. Chen et al. // Bone Marrow Transplant. – 2003. Vol.31(11). – P. 1043-1051.

### Summary

**О.М. Denysova, G.P. Zegunov, H.A. Hachbaui, B.B. Vachenko**  
**EFFICIENCY EMPLOYMENT OF COMBINED CRYOPRESERVATIVES**  
**FOR CRYOPRESERVATION OF BOVINES ERYTHROCYTE**

*The integrity of bovines erythrocytes after cryopreservation with protection combined cryopreservatives, containing penetrating (DMSO, 1,2-propane diol) and non-penetrative (PEG-1500) cryoprotectants were studied. Combination a penetrating cryoprotectants with a polymer promotes increase the protection efficiency during freezing-thawing.*

Рецензент – д.вет.н., професор Стефанік В.Ю.