

Криоконсервирование эритроцитов человека в криозащитных средах, содержащих комбинации криопротекторов

Ю.С. ЕСИПОВА, А.М. КОМПАНИЕЦ, А.В. НИКОЛЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Human Erythrocyte Cryopreservation in Cryoprotective Media, Containing Combinations of Cryoprotectants

YU.S. YESIPOVA, A.M. KOMPANIETS, A.V. NIKOLENKO
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Цель работы – исследование криозащитного действия сред, содержащих различные комбинации оксипропилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ (ОЭГ _{$n=25$}) с криопротекторами 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), диметилацетамидом (ДМАЦ) или диметилсульфоксидом (ДМСО) при замораживании эритроцитов человека.

Объектом исследования были эритроциты донорской крови человека, заготовленной на консерванте “Глюгидир” и хранившейся после эксфузии не более 2-х суток при 4°C. В качестве криозащитных сред использовали растворы, основу которых составлял непроницающий криопротектор ОЭГ _{$n=25$} в комбинациях с 1,2-ПД, DMAЦ или ДМСО в соотношениях 1:1; 2:1 и 5:1 в суммарной концентрации 30%. Растворы криопротекторов готовили на фосфатно-солевом буфере, pH 7,4 (ФСБ), контролем являлся 30%-й раствор ОЭГ _{$n=25$} на ФСБ. Образцы эритроцитов замораживали в полиэтиленовых ампулах вместимостью 2 мл погружением в жидкий азот; отогревали на водяной бане (40°C). Сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева оценивали по показателям гемолиза, осмотической хрупкости, гематокрита, свободного и общего гемоглобина.

Наиболее высокий уровень сохранности эритроцитов по всем исследуемым показателям получен после их замораживания с криозащитной средой, содержащей 15% ОЭГ _{$n=25$} и 15% DMAЦ. При этом уровень гемолиза составил $1,1 \pm 1\%$, показатели осмотической хрупкости – $4,3 \pm 1$ и $4,8 \pm 1,2\%$ в 0,9- и 0,6%-х растворах NaCl соответственно, содержание свободного гемоглобина – $2,2 \pm 1,1$ г/л. Применение криоконсервантов, содержащих комбинацию ОЭГ _{$n=25$} /DMAЦ в соотношении 2:1 и 5:1, сопровождалось увеличением осмотической хрупкости эритроцитов в среднем до 13,5–15,3%.

Для растворов, содержащих комбинации ОЭГ _{$n=25$} /1,2-ПД или ОЭГ _{$n=25$} /ДМСО, наиболее высокий уровень осмотической устойчивости эритроцитов получен при соотношении криопротекторов в растворе 5:1 – $11,5 \pm 1,4$ и $13,0 \pm 0,2\%$ в 0,9% NaCl; $17,2 \pm 4,0$ и $18,7 \pm 4,0\%$ в 0,6% NaCl соответственно. При других соотношениях этих криопротекторов в растворах осмотическая хрупкость возрастала до 91–99%. По таким показателям сохранности, как процент гемолиза и содержание свободного гемоглобина в надосадке размороженных эритроцитов, значительных отличий в уровне криозащитного действия для всех исследованных криоконсервантов не установлено.

Полученные результаты указывают на перспективность исследований по разработке для замораживания эритроцитов человека криозащитных сред на основе комбинаций криопротекторов.

The research aim is to investigate cryoprotective effect of media, containing different combinations of oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 25$ (OEG _{$n=25$}) with cryoprotectants 1,2-PD, DMAc or DMSO during freezing of human erythrocytes.

The research objects were erythrocytes of human donor's blood procured with the “Glucidur” preservative and stored after exsuffusion during not more than 2 days at 4°C. As cryoprotective media there were used the solutions, based on non-penetrating cryoprotectant OEG _{$n=25$} in combinations with 1,2-PD, DMAc or DMSO in the ratios: 1:1, 2:1 and 5:1 under total concentration of 30%. The solutions of cryoprotectants were prepared with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS), the control was 30% solution of OEG _{$n=25$} in PBS. The erythrocyte samples were frozen in 2 ml polyethylene ampoules by plunging into liquid nitrogen, thawed on water bath (40°C). Survival of erythrocytes after freeze-thawing was assessed on indices of hemolysis, osmotic fragility, hematocrit, free and total haemoglobin.

The highest level of erythrocyte integrity on all the studied parameters was obtained after their freezing with cryoprotective medium, containing 15% OEG _{$n=25$} and 15% DMAc. Herewith the level of hemolysis made $1.1 \pm 1\%$, the indices of osmotic fragility made $4.3 \pm 1\%$ and $4.8 \pm 1.2\%$ in 0.9 and 0.6% NaCl solutions, correspondingly, content of free haemoglobin was 2.2 ± 1.1 g/l. Application of cryoprotectants, containing the combination of OEG _{$n=25$} /DMAc in the ratios of 2:1 and 5:1 was accompanied with the rise of osmotic fragility of erythrocytes in average up to 13.5–15.3%.

For the solutions, containing combinations of OEG _{$n=25$} /1,2-PD or OEG _{$n=25$} /DMSO the highest level of osmotic resistance of erythrocytes was obtained for the ratio of cryoprotectants in the solution: 11.5 ± 1.4 for 5:1 and 13.0 ± 0.2 in 0.9% NaCl, 17.2 ± 4.0 and $18.7 \pm 4.0\%$ in 0.6% NaCl, correspondingly. Under other ratios of these cryoprotectants in the solutions osmotic fragility increased reaching 91–99%. On such integrity indices as hemolysis percentage and content of free haemoglobin in supernatant of thawed erythrocytes, no significant differences in level of cryoprotective effect for all the examined cryoprotectants were found.

The findings point to the perspective of researches on development of cryoprotective media, based on combination of cryoprotectants, for freezing of human erythrocytes.