

© П.Ю. Улишко, Г.Ф. Жегунов, Е.Н. Боброва, А.В. Зинченко

УДК 57.043:591.111.1:547.422

П.Ю. Улишко, Г.Ф. Жегунов, Е.Н. Боброва, А.В. Зинченко

## ВЛИЯНИЕ СМЕСЕЙ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СОХРАННОСТЬ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)  
Харьковская государственная зооветеринарная Академия (г. Харьков)

Данная работа проведена в рамках НИР ХГЗВА по теме «Экспериментальна обробка та розробка методів криоконсервування клітин та тканин домашніх та сільськогосподарських тварин, а також розробка методів отримання криоекстрактів з ембріональних тканин тварин та вивчення їх біологічної активності», № госрегистрации 0110U007535.

**Вступление.** Известно, что биологические объекты нуждаются в индивидуальном подходе при разработке технологии низкотемпературного консервирования. В настоящее время разработаны эффективные методы низкотемпературного консервирования эритроцитов человека, подобран ряд успешно применяемых защитных сред на основе глицерина [6], 1,2 – ПД [5], ДМСО [4], ПЭО-1500 [1]. Однако для эритроцитов млекопитающих, таких как бык, кролик и лошадь не разработаны среды, позволяющие достичь высокого уровня сохранности клеток. Глицерин и ПЭО-1500 не обладают достаточной криозащитной эффективностью при замораживании эритроцитов быка и лошади [2], а применение ДМСО позволяет сохранить не более 60% клеток [3].

Технологии криоконсервирования биологических объектов зачастую основываются на использовании комбинированных криозащитных сред, содержащих проникающие и непроникающие криопротекторы. Такой подход способствует сохранности ряда биологических свойств, например, сохранности осмотических свойств донорских эритроцитов [8]. В то же время, сохранность эритроцитов таких сельскохозяйственных животных, как бык, кролик и лошадь при криоконсервировании в присутствии многокомпонентных криозащитных сред ранее не исследовалась.

**Цель исследования.** Определение уровня гемолиза эритроцитов быка, кролика и лошади на различных этапах криоконсервирования с целью подбора наиболее эффективных защитных сред, включающих, как проникающие, так и не проникающие криопротекторы.

**Объект и методы исследования.** Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.). Все животные были половозрелыми самцами. Эритроциты получали из цельной крови быка, кроля и лошади заготовленной на консерванте «Глюгидир» в объемном соотношении 1:4. После удаления плазмы, эритроцитарную массу трижды отмывали

центрифугированием при 1300 g в течение 3 мин в 4-кратном объеме изотонического раствора NaCl (рН 7,4).

Многокомпонентные криоконсервирующие среды готовили на изотоническом растворе NaCl, содержащем 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,4. Исследовали криозащитную эффективность растворов, содержащих следующие концентрации криопротекторов:

1. 5% ПЭО-1500+15% ДМСО;
2. 10% ПЭО-1500 +10% ДМСО;
3. 20% ПЭО-1500+10% ДМСО;
4. 10% ПЭО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2 ПД + 10% сахарозы;
5. 15% ПЭО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахарозы;
6. 15% ПЭО-1500 + 15% ДМСО + 5% 1,2 - ПД + 5% сахарозы;
7. 20% ПЭО-1500 + 10% ДМСО + 5% 1,2 ПД + 5% сахарозы.
8. 10% ПЭО-1500 + 10% ДМСО + 10% 1,2-ПД + 5% сахарозы;
9. 20% ПЭО-1500 +5% ДМСО + 5% 1,2-ПД +5% сахарозы
10. 10%ПЭО-1500 + 10%ДМСО + 10% 1,2-ПД+ 10% маннит.

Криоконсервант добавляли по капельно к эритромассе в соотношении 1:1 при температуре 21°С и инкубировали в течение 15 минут. Замораживание осуществляли погружением в жидкий азот. Нагрев проводили на водяной бане при 40-42°С до появления жидкой фазы. Отмывание криопротектора осуществляли серийным центрифугированием. На первом этапе к суспензии эритроцитов добавляли равный объем 0,6 М NaCl, 10 мМ фосфатный буфер рН 7,4. После этого эритроциты дважды промывали 0,15 М NaCl, 10 мМ фосфатный буфер рН 7,4 [9].

Эффективность криозащитных сред при замораживании эритроцитов сельскохозяйственных животных оценивали по уровню гемолиза. Уровень гемолиза в надосадке измеряли на спектрофотометре "Pye Unicam SP 8000" (Англия) при длине волны 543 нм:

$$\text{процент гемолиза} = [A_1/A_2] \cdot 100,$$

где  $A_1$  – оптическая плотность надосадочной жидкости экспериментального образца;  $A_2$  – оптическая плотность при 100% гемолизе контрольного образца.

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная

## БИОЛОГИЯ

ошибка среднего. Различия между группами считали статистически достоверными при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследований и их обсуждение.** Действие повреждающих факторов криоконсервирования может приводить к развитию трансмембранных дефектов, возникновению крупных пор,

разрывов и, как следствие, гемолизу эритроцитов [13]. Данные по уровню гемолиза, полученные в настоящей работе для эритроцитов быка, кролика и лошади после инкубирования в криозащитной среде, после низкотемпературного воздействия и

Таблица 1

**Уровень гемолиза эритроцитов быка  
в процессе криоконсервирования с различными средами**

Среда	Гемолиз, %		
	После 15 мин инкубирования	После замораживания-отогрева	После замораживания-отогрева и отмывки
1	0,8±0,2	18,4±1,3	38,2±2,5
2	0,7±0,2	13,8±1,2	46,2±4,1
3	0,5±0,2	13,2±1,1	35,5±2,4
4	0,6±0,2	10,4±1,0	38,4±2,7
5	0,5±0,2	5,2±0,4	23,4±2,0
6	0,8±0,1	7,2±0,8	27,5±2,3
7	0,5±0,2	5,2±0,6	41,1±4,0
8	0,5±0,1	13,8±1,1	47,3±4,1
9	0,3±0,2	6,6±0,5	30,9±2,3
10	0,6±0,1	10,0±0,5	38,5±3,4

Таблица 2

**Уровень гемолиза эритроцитов кролика  
в процессе криоконсервирования с различными средами**

Среда	Гемолиз, %		
	После 15 мин инкубирования	После замораживания-отогрева	После замораживания-отогрева и отмывки
1	0,8±0,2	16,4±1,4	46,9±3,9
2	0,7±0,2	15,8±1,6	48,5±4,2
3	0,4±0,3	15,4±1,3	36,5±2,5
4	0,5±0,1	11,4±1,1	40,4±3,5
5	0,8±0,2	6,4±0,5	24,5±2,1
6	0,9±0,1	7,8±0,2	28,9±2,8
7	0,6±0,2	6,7±0,6	43,8±4,2
8	0,6±0,1	15,5±1,3	49,5±3,4
9	0,4±0,2	7,3±0,8	32,7±2,2
10	0,7±0,2	9,2±0,5	40,7±3,8

Таблица 3

**Уровень гемолиза эритроцитов лошади  
в процессе криоконсервирования с различными средами**

Среда	Гемолиз, %		
	После 15 мин инкубирования	После замораживания-отогрева	После замораживания-отогрева и отмывки
1	0,8±0,2	16,7±1,5	45,8±3,7
2	0,3±0,1	16,2±0,9	51,2±5,1
3	0,7±0,2	16,5±1,2	39,5±2,7
4	0,5±0,2	12,5±1,2	44,3±3,2
5	0,7±0,2	7,2±0,6	25,4±2,0
6	0,9±0,3	7,6±0,5	27,8±2,7
7	0,5±0,2	6,1±0,5	42,2±3,8
8	0,6±0,2	15,8±1,4	54,5±3,5
9	0,3±0,2	7,7±0,7	34,9±2,8
10	0,6±0,1	8,1±0,5	44,8±3,9

последующей процедуры перевода клеток в изотоническую среду приведены в таблицах 1, 2 и 3.

Из полученных данных видно, что уровень гемолиза после инкубирования эритроцитов с многокомпонентными средами не превышает 1%, что говорит о толерантном отношении клеток к криопротекторам при концентрациях, использованных в данной работе. После низкотемпературного воздействия уровень гемолиза максимально возрастает в суспензиях эритроцитов быка, кролика и лошади, смешанных со средой №1 и минимально - со средами №5 и 7. Так после замораживания в среде №5 гемолиз эритроцитов быка составляет всего 5,2%, кролика – 6,4%, а лошади – 7,2%. После процедуры удаления криопротектора и перевода в изотоническую среду уровень гемолиза существенно возрастает для всех исследованных сред, однако со средой №5 удается получить 74 ч 76% негемолизированных клеток.

Видно, что незначительная добавка в среду сахарозы позволяет существенно уменьшить гемолиз эритроцитов при замораживании. Использование ДМСО при концентрации в суспензии выше 5% приводит к достоверному повышению уровня гемолиза еще на этапе инкубирования. Ранее нами было показано, что криоконсервирование под защитой 10% ДМСО приводит к повышению осмотической хрупкости эритроцитов быка, кролика и лошади [10], что может быть связано со снижением микровязкости

мембран и увеличением их проницаемости [3, 12]. Повышение концентрации ПЭО-1500 позволяет существенно снизить уровень гемолиза эритроцитов на этапе замораживания – нагрева. Однако наблюдается резкое возрастание уровня гемолиза на этапе удаления криопротектора. Так, например, после замораживания эритроцитов под защитой криозащитной среды №7 уровень гемолиза составляет 5,2% для эритроцитов быка, 6,1% - эритроцитов лошади и 6,7% - эритроцитов кролика, а при отмывании криопротекторов возрастает до 41,1, 42,2 и 43,8%, соответственно. Эти факты могут быть связаны с «налипанием» криопротектора на поврежденные части мембран, отмывка ПЭО-1500 ведет к открытию поры и выходу гемоглобина [7, 11].

**Выводы.** Разработана многокомпонентная криозащитная среда, содержащая, как проникающие, так и непроникающие криопротекторы (15% ПЭО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД, 5% сахарозы). Криоконсервирование эритроцитов быка, кролика и лошади с использованием данной среды позволяет получить до 75% негемолизированных клеток.

**Перспективы дальнейших исследований.** Необходимо дальнейшее изучение состояния мембран эритроцитов млекопитающих после криоконсервирования в присутствии многокомпонентных криозащитных сред, содержащих проникающие и непроникающие криопротекторы.

### Список литературы

1. Бабийчук Л.А. Конформационные и объемные изменения эритроцитов в процессе замораживания-отогрева в зависимости от условий эквilibрации их с криопротектором ПЭО-1500 / Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 1997. – №3. – С.8-15.
2. Денисова О.Н. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленоксида, глицерина / О.Н. Денисова, Г.Ф. Жегунов, Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 195 – 201.
3. Денисова О.Н. Криочувствительность эритроцитов различных видов млекопитающих: автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.19 «Биология» / О.Н. Денисова – Харьков, 2006. – 20 с.
4. Долгосрочное хранение эритроцитов методом замораживания при умеренно низких (-60°С-40°С) температурах : Метод. рекомендации / Н.Т. Терехов, М.М. Петров, М.П. Буденная [и др.]. - Киев, 1986. - 41с.
5. Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта «Пропандиосахароль» : Метод. рекомендации / В.И. Грищенко, А.М. Воротилин, В.М. Гучок [и др.]. - Харьков, 1990. - 34с.
6. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий : Метод. рекомендации / В.А. Аграненко, Ф.Р. Виноград-Финкель, Л.И. Федорова - Москва, 1980. – 47 с.
7. Накагаки М. Физическая химия мембран / М. Накагаки; пер. с яп. А. В. Хачояна; Под ред. А. Д. Морозкина. - М.: Мир, 1991. – 253 с.
8. Рамазанов В.В. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами / В.В. Рамазанов, В.А. Бонадренко // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 47 – 58.
9. Семенова Н.В. Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания / Н.В. Семенова, Л.И. Федорова, В.Л. Виноградов // Гематология и трансфузиология. – 1986. - №10. – С.42-52.
10. Улизко П.Ю. Влияние криоконсервирования и ДМСО на сохранность и осмотическую хрупкость эритроцитов различных видов млекопитающих / П.Ю. Улизко, Г.Ф. Жегунов, О.Н. Денисова // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 1. – С. 52 – 57.
11. Engen R. L. High-performance liquid chromatography determination of erythrocyte membrane phospholipid composition in several animal species / R. L. Engen, C. L. Clark // Pak J. Physiol. – 1990 – Vol. 51, №1. – P. 577–580.
12. Kaneko J. J. Clinical Biochemistry of Domestic animals, fourth edition / J. J. Kaneko // Comp. Biochem. Physiol. – 1989 – Vol. 932, №1. – P. 185 – 224.
13. Rapatz G. Hemolysis in several animal species after rapid freezing of blood / G. Rapatz, B. Luyet // Journal of Cellular Physiology. – Vol. 77, Issue 3. - P. 373–376.

УДК 57.043:591.111.1:547.422

### **ВЛИЯНИЕ СМЕСЕЙ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СОХРАННОСТЬ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**Улизко П.Ю., Жегунов Г.Ф., Боброва Е.Н., Зинченко А.В.**

**Резюме.** В работе исследовано влияние многокомпонентных криозащитных сред, содержащих проникающие и непроникающие криопротекторы на гемолиз эритроцитов быка, кролика и лошади на различных этапах криоконсервирования. Найдена оптимальная криоконсервирующая среда, содержащая 15% ПЭГ-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД, 5% сахарозы, позволяющая сохранить до 75% негемолизированных клеток всех исследуемых млекопитающих в процессе криоконсервирования.

**Ключевые слова:** эритроциты млекопитающих, гемолиз, криоконсервирование, криоконсервирующие среды.

УДК 57.043:591.111.1:547.422

### **ВПЛИВ СУМІШЕЙ КРИОПРОТЕКТОРІВ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ КРИОКОНСЕРВОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ**

**Улізко П. Ю., Жегунов Г. Ф., Боброва О. М., Зінченко А. В.**

У роботі досліджено вплив багатокомпонентних криозахисних середовищ що містять проникаючі і непроникаючі криопротектори на гемоліз еритроцитів бика, кроля та коня на різних етапах криоконсервування. Знайдено оптимальне криоконсервуюче середовище, що містить 15% ПЕГ-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД, 5% сахарози, що дозволяє зберегти до 75% негемолізованих клітин усіх досліджуваних ссавців в процесі криоконсервування.

**Ключові слова:** еритроцити ссавців, гемоліз, криоконсервування.

UDC 57.043:591.111.1:547.422

### **Influence Of Mixtures Of Cryoprotective On Safety Of Cryopreservation Of Erythrocyte Of Mammals**

**Ulizko P. Y., Zinchenko O. V., Bobrova O. M., Zhegunov G. F.**

**Summary.** Influence of multicomponent cryoprotective environments is in-process investigational, containing penetrating and nonpenetrating cryoprotectors on hemolysis of red corpuscles of bull, rabbit and horse on the different stages of cryopreservation. An optimal cryoenvironments containing 15% PEG - 1500, 10% DMSO, 5% 1,2 PD, 5% saccharoses, allowing to save to 75% cages of all investigated mammals in the process of cryopreservation.

**Key words:** erythrocyte of mammals, hemolysis, cryopreservation, cryoenvironments.

Стаття надійшла 22.09.2011 р.