Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 2, No. 1, 2006, pp. 28-34.
Original Text Copyright © 2006 by Svedentsov, Tumanova, Chtcheglova, Solomina

ORIGINAL ARTICLE

CONSERVATION LEUKOCYTES IN THE CONDITIONS OF CRYOANABIOSIS (-40^{0}C)

Svedentsov E.P., Chtcheglova O.O., Tumanova T.V., Solomina O.N.

Laboratory cryophysiology of blood, Komi Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, 167982 Syktyvkar, Russia

Received November 3, 2005

Trying to meet the requirements in leukocytes the clinicists are facing the pressing problem of conservation of cells in a functionally valid condition which is possible in deep cryoanabiosis (-196°C). This conservation method is not, for the number of reasons, available for the purpose of a wide use. The aim of the present was development of an efficient, readily available and economical method for conservation of leukocytes at a moderately low temperature of -40°C. It was shown that use of this method allows for conservation of blood nuclear cells in a functionally valid condition for a period of 30 days.

*Key words: **l**eukocytes / cryoanabiosis / cryopreservative / exponential programme for freezing*

ORIGINAL ARTICLE

СОХРАННОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ КРИОАНАБИОЗА (-40°С)

Сведенцов Е.П., Щеглова О.О., Туманова Т.В., Соломина О.Н.

Лаборатория криофизиологии крови, Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар 167982, Россия

Поступила в редакцию 3 ноября 2005

Для реализации потребности в лейкоцитах перед клиницистами остро встает проблема сохранения данных клеток длительное время в функционально полноценном состоянии, что возможно в условиях глубокого криоанабиоза (-196^{0}С). Данный способ консервирования по ряду причин не доступен для широкого применения. Поэтому целью работы явилась разработка эффективного, доступного и экономичного способа сохранения лейкоцитов при умеренно-низкой температуре -40^{0}С. Показано, что применение данного способа позволяет сохранять ядерные клетки крови в функционально полноценном состоянии до 30 суток.

Key words: лейкоциты / криоанабиоз / криоконсервант / экспоненциальная программа замораживания

В настоящее время в связи с расширением показаний к применению концентратов лейкоцитов (лейкопения, гипо- и апластические состояния кроветворения, тяжелый сепсис и др.) возникла проблема создания их запасов. На протяжении многих лет ряд ученых (Пушкарь Н.С. и др., 1978; Аграненко В.А. и др., 1982) ведет поиск оптимальных методов замораживания и длительного хранения лейкоцитов. Немногочисленные данные литературы (Махатадзе И.К. и др., 1975; Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С., 1994) свидетельствуют о том, что в настоящее время единственным эффективным методом долгосрочного хранения гранулоцитов является их замораживание при ультранизкой (–196^{0}С) температуре.

Сохранение жизнеспособности лейкоцитов крови при положительных температурах встречает значительные трудности в связи с быстрым затуханием энергетического обмена, что в свою очередь связано с более сложной внутренней структурой клеток. Так, например, мембраны гранул лейкоцитов весьма чувствительны к любого рода воздействиям (изменению pH, температуры среды и т.д.) и при нарушении их целостности, содержащиеся в гранулах гидролитические ферменты (фагоцитин, лизоцин), выходят в цитоплазму клетки, вызывая ее гибель.

Накопленный опыт по хранению ядерных клеток крови свидетельствует о том, что продлить жизнеспособность лейкоцитов в условиях положительных температур, т.е. при +4^{0}С возможно до 24 часов (Заривчатский М.Ф., 1995), при температуре от 0 до –4^{0}С в течение 48 часов (Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994), при низкой температуре (-80^{0}С) - 12 месяцев (Утемов С.В. и др., 1999; Сведенцов Е.П. и др., 2001), при ультранизкой (–196^{0}С) - в среднем до 20 месяцев (Аграненко В.А. и др., 1982). Следует отметить, что существующие методы замораживания до -196°С и хранения при данной температуре требуют применения дорогостоящего оборудования, жидкого азота и обслуживания высококвалифицированного персонала, что делает технологию криоконсервирования сложной, громоздкой и экономически неэффективной и не позволяет вводить ее в широкую практику. Поэтому весьма актуальным является создание простого, эффективного и экономичного метода криоконсервирования лейкоцитов, но без использования жидкоазотной технологии. Приоритетность данной темы исследования обусловлена особенно тем, что в доступной отечественной и зарубежной литературе сведений о методах, позволяющих сохранить функцию лейкоцитов, в том числе гранулоцитов, при умеренно-низкой (-40^0 С) температуре не имеется. На основании выше указанного была сформулирована следующая цель исследования: разработать эффективный, доступный и экономичный способ сохранения лейкоцитов при умеренно-низкой температуре (-40^{0}С).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил концентрат лейкоцитов (ЛК), выделенный из цельной донорской крови при цитаферезе. Полученное количество ЛК в среднем составляло 21,27±5,3 мл. Смешивание ЛК с криоконсервантом, включающим в себя криопротектор гексаметиленбистетраоксиэтилмочевину (ГМБТОЭМ), антигипоксант фумарат натрия и лимонную кислоту (Патент на изобретение №2184449), производили в соотношении 1:1 и эквилибрировали при комнатной температуре в течение 20 минут. После этого клеточная взвесь подвергалась замораживанию по экспоненциальной программе до –40^{0}С. Для этого подготовленный биообъект погружали в заполненную хладоносителем (96% этиловым спиртом) 4-литровую ванну камеры электроморозильника «Криостат», охлажденную до -28°С. После 18 минут экспозиции в данной камере биоматериал переносили в электроморозильник с температурой -40^{0}С для дальнейшего замораживания и хранения. Регистрацию температуры замораживания осуществляли с помощью прибора ГСП – 04, датчик которого был установлен в одном из контейнеров с имитатором – криоконсервантом с конечной концентрацией его ингредиентов, как при смешивании с ЛК. При температуре –40^{0}С биообъект с предложенным криоконсервантом хранили 1 и 30 суток. Быстрое размораживание ЛК производили в 20-литровой водяной ванне при температуре +38^{0}С в течение 45-60 сек (в зависимости от объема ЛК) при интенсивном покачивании контейнера (3-4 раза в секунду) для предотвращения процессов рекристаллизации до температуры биообъекта +2^{0}С÷+4^{0}С.

Изучение функциональных свойств лейкоцитов осуществляли до введения в холодовой анабиоз и после выхода из него по общепринятым лабораторным методикам: определение эозинорезистентности лейкоцитов (Shreck R., 1936), изучение фагоцитарной активности нейтрофилов (Потапова С.Г. и др., 1977), проведение оценки окислительно-восстановительного метаболизма нейтрофилов по НСТ-тесту (Гольдберг Е.Д. и др., 1992), изучение функционального состояния нейтрофилов с помощью лизосомально-катионного теста (Славинский А.А., Никитина Г.В., 1999), оценка содержания Т- и В-лимфоцитов в ЛК с помощью моноклональных антител в непрямом иммунофлуоресцентном тесте (Кондратьева И.А., Ярилин А.А., 2004).

Результаты исследования (всего 456 наблюдений), обработаны методами параметрической статистики; результаты выражали в виде M±σ, а различия оценивали по критерию Стьюдента (Гланц С., 1998); их считали достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение эозинорезистентности лейкоцитов показало, что после размораживания через 1 и 30 суток холодового анабиоза наблюдалось достоверное ($p<0,05$) снижение уровня клеток с сохраненным свойством избирательной проницаемости мембраны. Относительные данные свидетельствуют о том, что после 30 суточного хранения количество жизнеспособных лейкоцитов было достоверно ($p<0,05$) ниже – 70,1±14,9%, чем после хранения в течение 1 суток – 84,3±6,6%.

Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов (процентное отношение фагоцитирующих клеток к общему числу сосчитанных) показало (табл.1, рис.1, 2), что образование фагосом, содержащих поглощенные частицы латекса, наблюдалось в течение 1 и 30 суток хранения биообъекта в условиях холодового анабиоза (–40^{0}С) без достоверного отличия как от исходного уровня, так и указанных сроков хранения. Однако прослеживалась тенденция к снижению фагоцитарной активности к 30 суткам.

Процент активированных нейтрофилов, т.е. содержащих диформазан, достоверно ($p<0,05$) увеличивался после размораживания (табл.1), что, согласно данным литературы (Granfeldt D. et al., 2002; Зинкин В.Ю., Годков М.А., 2004), отражает проявление респираторного взрыва нейтрофилов. Спустя сутки хранения этот показатель возрастал в 3,1 раза, после 30 суток хранения рост этого показателя был более выраженным ($p<0,05$) – 4,3 раза.

Определение содержания соединений, обеспечивающих микробицидность нейтрофилов без участия кислорода с помощью лизосомально-катионного теста показало (табл.1), что средний цитохимический коэффициент (СЦК) достоверно ($p<0,05$) снижался после размораживания через все сроки хранения. Кроме того, данный показатель после 30 суточного хранения в условиях холодового стресса оказался достоверно ($p<0,05$) ниже в отличие от хранения в течение 1 суток.

При умеренно-низкой температуре -40°С после размораживания исследуемой биосреды через одни сутки наблюдалось достоверное ($p<0,05$) увеличение в ней численности Т-лимфоцитов и снижение В-лимфоцитов (табл.2) в сравнении с исходным (до замораживания) уровнем.

Таблица 1 Функциональное состояние нейтрофилов, перенесших холодовой анабиоз (-40°С) разной длительности

Сроки Хране-ния (сутки)	Количество фагацитарно активных НФ			Количество диформазанположительных НФ		СЦК по ЛКТ		
	до замор.	после размор.		до замор.	после размор.	до замор.	после размор.	
	в % к общему числу НФ	в % к общему числу НФ	в % к исх. уровню	в % к общему числу НФ	в % к общему числу НФ	В у.е.	В у.е.	в % к исх. уровню
1	41,9±4,7	39,8±3,6	95,9±4,5	21,75±3,9	67,33±6,4*	2,3±0,5	1,6±0,3*	81,8±12,4
30	46,7±5,2	43,0±6,8	92,2±6,4	22,33±1,9	96,80±7,2*#	1,1±0,1#	1,1±0,2#	102,0±9,1#

Примечание: НФ – нейтрофилы, ЛКТ – лизосомально-катионный тест, СЦК – средний цитохимический коэффициент; * - различие с исходным уровнем (до замораживания) достоверно ($p<0,05$); # - различие с данными через 1 сутки достоверно ($p<0,05$).

Таблица 2 Содержание Т и В-лимфоцитов в лейкоконцентратах, подвергнутых холодовому воздействию (-40°С) разной длительности

Состояние ЛК (n=5)		Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %
ЛК, смешанный с криоконсервантом 1:1	до замораживания	82,80±1,92	9,25±3,86
	после размораживания	88,33±2,08 *	2,67±0,58 *

Примечание: ЛК- лейкоцитный концентрат; * - различие с исходным уровнем (до замораживания) достоверно ($p<0,05$).

Рис. 1. Нейтрофил, фагоцитировавший частицы латекса до замораживания (увеличение в 1500 раз)

Рис. 2. Нейтрофил, фагоцитировавший частицы латекса после оттаивания (увеличение в 1500 раз)

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению механизмов криоповреждения и криозащиты ядерных клеток крови (Иткин Ю.А. и др., 1983; Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994; Svedentsov E.P. et al., 1998; Halle P. et al., 2001), проблема сохранения этих объектов еще далека от своего окончательного разрешения.

Степень криоповреждения в первую очередь определяется глубиной анабиотического состояния клетки. Во избежание механического разрушения мембран клетки и ее органелл образующимися кристаллами при фазовом переходе вода-лед и денатурации клеточных белков при повышении концентрации солей в межкристаллических пространствах нами был использован отечественный криопротектор смешанного действия ГМБТОЭМ (Сведенцов Е.П. и др., 1997), который стабилизирует как фракции внеклеточной воды, так и внутриклеточной. Показано (Осташко В.Ф., Осташко Ф.И., 2004), что температурный шок смягчается или вообще не проявляется при медленном экспоненциальном снижении температуры клеточной суспензии. Использование данной программы позволяет избежать процессов рекристаллизации в процессе замораживания биообъекта. Кроме того, экспоненциальная программа замораживания не требует применения дорогостоящей жидкоазотной технологии и является весьма экономичной. Вероятно, используемый нами криопротектор, позволяющий избежать глубоких фазовых изменений и нарушения барьерных свойств мембран лейкоцитов, а также примененная экспоненциальная программа замораживания позволили нам сохранить большой процент (70,1±14,9%) жизнеспособных клеток после их размораживания.

Лейкоциты в отличие от других клеток крови обладают повышенным обменом веществ, который при умеренно-низкой температуре (-40°C) замедляется, но продолжается, так как в клетках в незамерзшем состоянии остаются часть связанной и вся фракция фиксированной воды; поэтому энергетические запасы лейкоцитов продолжают расходоваться (Сведенцов Е.П., 2004). Для поддержания метаболизма лейкоцитов в состав хладоограждающего раствора нами был включен антигипоксант биоэнергетической направленности фумарат натрия, который необходим для нормализации цикла Кребса в клетках как во время воздействия холодового стресса, так и после него. Нами было установлено, что после нахождения нейтрофилов в состоянии холодового анабиоза при -40°C количество НСТ-положительных клеток существенно увеличивалось и после 30 суток хранения резервные функции системы, генерирующей активные формы кислорода, были использованы почти полностью. Таким образом, применение данной ограждающей среды и экспоненциальной программы замораживания позволяет поддерживать метаболизм нейтрофилов, подвергнутых холодовому стрессу (-40°C) до 30 суток.

Образование кислородных радикалов является подготовительным этапом фагоцитоза (Герасимов И.Г., 2004). Полученные нами данные в НСТ-тесте коррелируют с результатами определения способности нейтрофилов к фагоцитозу. Нами установлено, что через 30 суток холодового анабиоза 92,2±6,4% нейтрофилов сохраняют способность к образованию фагосом с инертными частицами латекса.

Данные литературы свидетельствуют (Обозная Э.И. и др., 1981; Славинский А.А., Никитина Г.В., 1999), что лизосомально-катионные белки локализуются как в первичных пероксидазопозитивных (азурофильных), так и во вторичных пероксидазонегативных (специфических) гранулах нейтрофилов. Согласно результатам лизосомально-катионного теста наблюдается достоверное ($p<0,05$) снижение СЦК к 30 суткам. Мы предполагаем, что это может быть связано с повреждением первичных и вторичных гранул нейтрофилов в процессе длительного холодового воздействия.

Среди лейкоцитов лимфоциты являются наиболее устойчивыми к действию холода клетками, кроме того, устойчивость В-лимфоцитов к замораживанию до -196°С выше, чем Т-лимфоцитов (Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994). Нами установлено, что при умеренно-низкой температуре -40°С наиболее чувствительными к холодовому стрессу оказались В-лимфоциты. Таким образом, при различных температурных воздействиях популяции лимфоцитов ведут себя неоднозначно, что может быть использовано в практике для обогащения трансфузионной среды необходимой фракцией лимфоцитов.

Таким образом, предложен эффективный, доступный и экономичный способ сохранения лейкоцитов при умеренно-низкой температуре -40°С в функционально полноценном в течение 30 суток. Данный способ может быть рекомендован к использованию в научных учреждениях медицинского и биологического профиля.

Таким образом, патогенные для человека бактерии способны проникать в ткани растительного организма и колонизировать их, не вызывая при этом четко выраженных симптомов заражения, но сохраняя свою вирулентность. Это указывает на возможный риск заболевания при употреблении зараженных овощей и фруктов.

.

ЛИТЕРАТУРА

Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Ермолович С.В. (1982) Биологические свойства криоконсервированных лейкоцитов и их клиническое применение. *Пробл. гематологии и переливания крови*, 4, 6-10.

Белоус А.М., Грищенко В.И. (1994) *Никитина И.И.* Криобиология, Наукова Думка, Киев.

Герасимов И.Г. (2004) Неоднородность нейтрофилов в фагоцитозе и респираторном взрыве. *Клиническая лаб. диагностика*, 6, 34-36.

Гланц С. (1998) Медико–биологическая статистика, Практика, Москва.

Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. (1992) Методы культуры ткани в гематологии, Изд-во Томского гос. ун-та, Томск.

Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. (1994) *Никитина И.И.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий, Наукова Думка, Киев.

Зинкин В.Ю., Годков М.А. (2004) Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека. *Клиническая лаб. диагностика*, 8, 26-29.

Иткин Ю.А., Бронштейн В.Л., Гордиенко Е.А., Марценюк В.Ф. (1983) Консервирование клеточных суспензий, *Замораживание: факторы, механизмы и гипотезы криоповреждения биологический суспензий*. Наукова Думка, Киев, С. 26-34.

Махатадзе И.К., Каличава Л.Х., Мгебришвили Н.Н., Кахиани Ш.В. (1975) Корреляция скоростей охлаждения с ограждающей средой в поиске оптимальных режимов замораживания гранулоцитов. *Пробл. гематологии и переливания крови*, 9, 25-27.

Обозная Э.И., Пушкарь Н.С., Маркова О.П., Панков Е.Я. (1981) Цитохимия замороженной клетки, *Локализация и функциональное значение ферментов и веществ в клетках костного мозга и* крови. Наукова Думка, Киев, С.38-43.

Основы трансфузиологии (1995) *Заривчацкий М.Ф.*, Изд-во Пермского ун-та, Пермь.

Осташко В.Ф., Осташко Ф.И. (2004) Температурный шок клеток как гидравлический удар в резонансной системе. *Цитология*, 46, 831-833.

Потапова С.Г., Хрустиков В.С., Демидова Н.В., Козинец Г.И. (1977) Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса. *Пробл. гематологии и переливания крови*, 9, 58-59.

Практикум по иммунологии (2004) *Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Исследование клеточного иммунитета в клинике*, Академия, Москва, С. 182-184.

Пушкарь Н.С., Лобынцева Г.С., Полякова А.И. и др. (1978) Разработка оптимальных режимов программного замораживания лейкоцитов. *Пробл. гематологии и переливания крови*, 8, 8-13.

Сведенцов Е.П. (2004) К классификации разных уровней отрицательных температур, используемых для консервирования биообъектов. *Материалы научной сессии НИИ и ВУЗов*, Изд-во Кировского

областного Бюро медицинской статистики и информатики, Киров, С. 117-120.

Сведенцов Е.П., Архиреев В.П., Утемов С.В. (1997) Физико-химические и токсико-фармакологические характеристики жидкой формы криопротектора А-378. *Актуальные вопросы трансфузионной и клинической медицины: Мат-лы науч. конф*, Киров, С. 34.

Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Семенов А.Н.. Хомякова С.А., Костяев А.А., Утемов С.В. Патент на изобретение № 2184449. Криозащитный раствор для замораживания лейкоцитов при умеренно-низкой температуре. Опубл. 10.07.2002, Бюл.19.

Сведенцов Е.П., Утемов С.В., Костяев А.А., Туманова Т.В. (2001) Функциональная активность лейкоцитов, подвергнутых холодовому (-80°C) анабиозу. *Восемнадцатый съезд физиологического общества им. И.П. Павлова*, Казань, С. 421-422.

Славинский А.А., Никитина Г.В. (1999) Цитохимическое выявление катионных белков в гранулоцитах крови амидо черным 10Б для визуальной оценки и компьютерного анализа изображения. *Клиническая лаб. диагностика*, 2, 35-37.

Утемов С.В., Сведенцов Е.П., Костяев А.А., Новосадов В.М. (1999) Криоконсервирование лейкоцитов с новым ограждающим раствором. *Вопросы трансфузионной и клинической медицины (Мат-лы 6-й научной конференции молодых ученых)*, Киров, С. 28.

Granfeldt D., Samuelsson M., Karlsson A. (2002) Capacitative Ca^{2+} influx and activation of the neutrophils respiratory burst. Different regulation of plasma membrane- and granule-localized NADPH-oxidase. *J. of Leukocyte Biol.*, 71, 611-617.

Halle P., Tournilhac O., Knopinska-Posluszny W. (2001) Uncontrolled – rate freezing and storage at –80^{0}C, with only 3,5 – percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion*, 41, 667-673.

Scheck R. (1936) A method for counting the viable cells in normal and malignant cell suspension. *Ann. J. Cancer*, 28, 389-391.

Svedentsov E.P., Archireyev V.P., Utyomov S.V. (1998) Low temperature leukocyte concentrate conserving. *Vox Sanguineous. 25th Congress JSBT*, Oslo, Norway, Abstract 1254.