

ORIGINAL ARTICLE

**Efficiency of application original preservatives for conservation
leukocytes at -40 ° C**

**Zaytseva*¹ O.O., Polejaeva¹ T.V., Svedentsov¹ E.P., Solomina¹ O.N.,
Utemov² S.V.**

¹ *Laboratory cryophysiology of blood, Physiology Institute at the Scientific Center affiliated to the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Komi Republic, 167982 Syktyvkar, Russia*

² *Laboratory conservation of blood and tissues, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, 610027 Kirov, Russia*

*E-mail: ddic@yandex.ru

Received September 21, 2011

When frozen leukocytes exposed to harmful factors of the complex, due to their complex cellular structure and high metabolism. Cryopreservatives allow to avoid damages, but most of which are toxic. The aim of the present was to compare the efficacy of application of two non-toxic solutions for conservation of leukocytes at -40°C for 1 day. It was show that solution containing cryoprotector mixed action (a derivative of urea) and antihypoxant (sodium fumarate) is most effective in preserving the functional activity of leukocytes.

Key words: leukocytes / cryopreservative

ORIGINAL ARTICLE

**Эффективность применения оригинальных криофилактиков
для сохранности лейкоцитов при -40°C****Зайцева*¹ О.О., Полежаева¹ Т.В., Сведенцов¹ Е.П., Соломина¹ О.Н.,****Утемов² С.В.**

¹ *Лаборатория криофизиологии крови, Учреждение Российской академии наук Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар 167982, Россия*

² *Лаборатория консервирования крови и тканей, ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России», г. Киров 610027, Россия*

*E-mail: ddic@yandex.ru

Поступила в редакцию 21 сентября 2011

При замораживании лейкоциты подвергаются воздействию комплекса повреждающих факторов, в связи с их сложной клеточной структурой и высоким метаболизмом. Избежать повреждений позволяют криофилактики, большинство из которых токсичны. Целью работы явилось сравнение эффективности применения двух малотоксичных растворов для консервирования лейкоцитов при -40°C в течение 1 суток. Установлено, что раствор, содержащий криопротектор смешанного действия (производное мочевины) и антигипоксанта (фумарат натрия) наиболее эффективно способствует сохранению функциональной активности лейкоцитов.

Key words: лейкоциты / криофилактик

Известно (Щуцаева А.А. и др., 2004), что криоустойчивость биологических объектов зависит от исходного состояния белоксинтезирующей системы и процессов биоэнергетики. После воздействия отрицательной температуры повышается проницаемость мембран клеток, изменяется

топография распределения рецепторов на поверхности мембран, ингибируются процессы эндогенного дыхания и гликолиза, снижается степень сопряженности процессов окисления и фосфорилирования вследствие нарушения дыхательной цепи митохондрий, ингибируется продукция АТФ.

В силу того, что лейкоциты являются сложными ядродержащими клетками, склонными к адгезии и необратимой агрегации, их гибель в процессе хранения в условиях низких температур происходит в течение нескольких дней. Уже через сутки в некоторых из них обнаруживали заметные изменения ультраструктур цитоплазмы, изменения в строении специфических гранул – отслоение содержимого гранул, разрушение их пограничной мембраны, лизис гранул. В результате последнего (Терентьева Э.И. и др., 1978) гидролитические ферменты поступают внутрь клетки и начинается внутриклеточное переваривание различных ее фрагментов, что влечет за собой усиленный пиноцитоз, множественное вакуолеобразование, изменение структур эндоплазматической сети, митохондрий и других органелл.

Многообразие проявлений криповреждений в клетке зависит от основного фактора – фазового перехода воды в лед (Иткин Ю.А. и др., 1983). Поэтому, чем больше сохранится незамерзающих фракций свободной и связанной воды, тем больше шансов у клетки выжить после воздействия отрицательных температур, так как первая фракция является средой для переноса веществ (ионов, метаболитов), регулирует интенсивность метаболических и физиологических процессов, в то время как вторая играет важную роль в поддержании структуры и функции каталитических и транспортных белков клетки (Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994). Сохранение незамерзающих различных фракций воды может быть достигнуто путем добавления криофилактических веществ, действие которых основано главным образом на их способности создавать прочные связи с молекулами воды вне

и внутри клетки, более прочные, чем связи воды между собой (Сведенцов Е.П., 1999). Кроме того, криофилактики способны снижать концентрацию солей, что делает минимальным риск повреждения белковых структур клеток (Цуцаева А.А., 1983). И, наконец, криозащитные вещества способны образовывать связи со структурными компонентами мембраны клеток, предохраняя их от разрушения кристаллами при замораживании (Виноград – Финкель Ф.Р., Киселев А.Е., 1970; Pushkar N.S. et al., 1976; Смольянинова Е.И. и др., 2004).

Большинство используемых в настоящее время криофилактиков оказывают на клетки токсическое действие, требуется удаление их из размороженных биобъектов путем отмывания. Это дополнительно травмирует клетки, особенно лейкоциты. Более того, отмывание эндоцеллюлярных криопротекторов необходимо и по причине вызова у клеток постгипертонического лизиса (обводнения) после их отогрева, что ведет к механическому разрушению плазматической мембраны клетки и ее гибели.

В предложенной работе проведено сравнение эффективности применения двух оригинальных нетоксичных криофилактиков для сохранения функций лейкоцитов крови человека при замораживании до умеренно-низкой температуры (-40°C).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовано 30 лейкоцитных концентратов (ЛК), полученных из цельной крови доноров с их информированного согласия методом цитафереза. Полученное количество ЛК в среднем составило $15,3 \pm 4,6$ мл.

Перед замораживанием ЛК смешивали с одним из двух криофилактиков в соотношении

1:1 и экспонировали при комнатной температуре в течение 20 мин. В состав первого криофиликтика (далее раствор №1) включены следующие ингредиенты: криопротектор экзо- и эндоцеллюлярного действия гексаметиленбистетрагидроксиэтилмочевина (ГМБТОЭМ), антигипоксанта биоэнергетической направленности фумарат натрия и антикоагулянт лимонная кислота, которая еще служила для доведения pH его до физиологической нормы 7,0-7,4 (Патент на изобретение РФ № 2184449).

В состав второго криофиликтика (далее раствор №2) были включены следующие ингредиенты: криопротектор эндоцеллюлярного действия 1,2-пропандиол; криопротектор со слабым экзоцеллюлярным действием гидроксиэтилкрахмал; «реставрирующая» добавка сукцинат гидроксиметилэтиллипидина, оказывающая антиоксидантное, антигипоксическое, мембраностабилизирующее и стресс-протекторное действия и являющаяся лекарственным средством; представитель комплекса витаминов группы «В» и лекарственное средство холина хлорид, оказывающий мембранопротекторное, липотропное, антидепрессантное действия; вещество, обладающее слабыми экзоцеллюлярными свойствами биоэнергетической направленности глюкоза. В ранних исследованиях путем опытного подбора были установлены оптимальные конечные концентрации ингредиентов раствора №2, используемые в данной работе.

С каждым раствором выполнено по 15 исследований.

Замораживание биообъекта проводили по медленной нелинейной программе: на 1-ом этапе скорость замораживания составила 8-10°/мин до

точки эвтектики (-11,5°С), на 2-ом этапе - 1-2°/мин до температуры -28°С и на 3-ем - 0,3-0,6°/мин до -40°С. Для этого контейнер с лейкоцитами погружали в заполненную хладоносителем (96% этиловым спиртом) 4-литровую ванну камеры электроморозильника «Криостат», охлажденную до -28°С (температура адаптации), где происходило замораживание клеточной взвеси до указанной температуры в течение 27 минут. Затем смесь переносили для дальнейшего замораживания и хранения в электроморозильник на -40°С. Хранили образцы в течение 1 суток. Регистрацию температуры осуществляли с помощью прибора ГСП-04, датчик ТСМ-3-02 которого был установлен в одном из контейнеров с имитатором - криозащитным раствором с конечной концентрацией его ингредиентов.

Быстрое размораживание ЛК производили в 20-литровой водяной ванне при температуре +38°С в течение 30-50 сек (в зависимости от объема биообъекта и используемого криоконсерванта) при интенсивном покачивании контейнера (3-4 раза в секунду) для предотвращения процессов рекристаллизации до температуры биообъекта +2°С÷+4°С.

Оценку функциональных и морфологических показателей лейкоцитов проводили до и после замораживания по общепринятым лабораторным методикам (Сведенцов Е.П. и др., 2008): подсчет общего количества лейкоцитов в камере Горяева, определение морфологического состава ядерных клеток в лейкоформуле, оценка эозинорезистентности лейкоцитов, изучение фагоцитарной активности нейтрофилов.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке: вычисляли среднее арифметическое значение, среднее

квадратичное отклонение. Достоверность различия между показателями оценивали по критерию Уилкоксона (Гланц С., 1998).

Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1 Показатели лейкоцитов, замороженных до умеренно-низкой температуры (-40°C ; 1 сутки) под защитой растворов №1 и №2

раствор (№)	Показатели лейкоцитов ($M \pm \sigma$)		
	до замораживания (ед. измерения)	после размораживания	
		ед. измерения	в % к исходному уровню
Количество лейкоцитов			
1	10560 \pm 581 в 1 мкл	9890 \pm 950 в 1 мкл	93,7 \pm 3,6*
2	27240 \pm 4053 в 1 мкл	23140 \pm 2442 в 1 мкл	85,4 \pm 7,1
Эозинорезистентность лейкоцитов			
1	94,3 \pm 5,3 %	70,5 \pm 1,3 %	75,8 \pm 4,7
2	97,4 \pm 0,5 %	77,0 \pm 1,1 %	79,0 \pm 0,6
Количество гранулоцитов			
1	32,1 \pm 3,3 %	29,0 \pm 2,8 %	90,2 \pm 3,5*
2	42,0 \pm 2,7 %	31,2 \pm 1,3 %	74,6 \pm 6,6
Фагоцитарная активность нейтрофилов			
1	40,0 \pm 2,1 %	39,3 \pm 1,5 %	97,5 \pm 2,6*
2	52,3 \pm 2,1 %	34,7 \pm 3,7 %	66,0 \pm 4,6

Примечание: * - различия с данными, полученными при использовании раствора №1 достоверны ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено (табл.1), что после отогрева лейкоцитов, хранившихся при -40°C в течение 1 суток с раствором №1 общее количество клеток, а также количество морфологически полноценных гранулоцитов и количество нейтрофилов, способных к фагоцитозу достоверно ($p < 0,05$) выше, чем с раствором №2. При оценке эозинорезистентности лейкоцитов с применением как раствора №1, так и раствора №2 достоверной разницы между ними выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Степень криповреждения лейкоцитов, замороженных с раствором №1 в наших исследованиях была достоверно ниже, чем с раствором №2. Мы полагаем, что это связано в первую очередь с тем, что его основным составляющим является криопротектор смешанного действия – ГМБТОЭМ. В настоящее время это новый, мало известный, и еще не вошедший в широкое применение криофилактик. Молекулярная масса его такова (378), что он способен в небольшом количестве проникать внутрь клетки, стабилизировать свободную и связанную воду, и снижать концентрацию солей, минимизируя риск повреждения белковых структур клеток.

Основная же часть протектора действует снаружи клетки, также взаимодействуя с водой, что чрезвычайно важно при замораживании, так как кристаллы льда в охлаждаемой клеточной суспензии образуются первоначально вне клеток (Белоус А.М. и др., 1987). Наконец, ГМБТОЭМ стабилизирует плазматическую мембрану клетки, взаимодействуя с ее структурными компонентами. Свое действие криопротектор начинает оказывать еще задолго до замораживания – во время 20 минутной экспозиции при комнатной температуре. Это время является оптимальным для того, чтобы он проник внутрь клетки через гидрофильные водные каналы и подготовил ее к последующим этапам замораживания. Действие протектора продолжается и в начальный период замораживания, когда биообъект помещают в спиртовую камеру, охлажденную до температуры адаптации (-28°C).

Раствор №2 оказался менее эффективным. Главной составляющей этого раствора явился широко известный и используемый для консервирования эритроцитов при -80÷-140°C (Вильянинов В.Н., 1973) эндоцеллюлярный протектор 1,2-пропандиол, а также новый, мало изученный протектор – холина хлорид. По данным исследователей Института криобиологии и криомедицины г. Харькова (Гулевский А.К. и др., 1987) последний при криоконсервировании эритроцитов (-196°C) оказывает мембранопротекторное действие и благодаря наличию гидроксильной группы способен связывать воду. Однако, учитывая относительную непроницаемость катиона холина для большинства плазматических мембран, трудно было бы ожидать эффективного криопротекторного действия этого соединения на уровне целых клеток. Кроме того в состав

раствора №2 для стабилизации внеклеточной воды и плазматической мембраны лейкоцитов были введены также давно апробированные вещества гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) и глюкоза, у которых экзоцеллюлярное действие выражено довольно слабо. Вероятно, именно из-за недостаточной защиты клеток «снаружи», их количество и уровень вовлеченности в фагоцитоз оказались ниже, чем при использовании криопротектора ГМБТОЭМ.

Известно, что проникающие криопротекторы, как правило, обеспечивают более эффективную защиту биологических структур при вымораживании воды, чем непроницающие, но их применение зачастую наталкивается на ряд серьезных трудностей, связанных как с оказанием ими на клетки повреждающего действия в цикле криоконсервирования и даже на этапе подготовки к замораживанию (Овсянников С.Е. и др., 2008), так и с возвращением клеток после отогрева в изотоническую среду (Белоус А.М. и др., 1987). Хотя в нашем исследовании применялась нетоксичная концентрация (21%) 1,2-пропандиола, но, видимо, и она оказалась достаточно гипертонической, что привело к постгипертоническому лизису 25% гранулоцитов после отогрева. Следует также заметить, что высокая проницаемость криопротектора через плазматическую мембрану отнюдь не подразумевает столь же высокую его проницаемость через мембраны органелл, например, лизосом, защищая тем самым их в процессе замораживания. Вероятно, именно при повреждении указанных органелл повышается концентрация в цитоплазме высокоактивных гидролаз, оказывающих лизирующее действие на ядро, митохондрии и другие органеллы, что приводит в конечном итоге к «перевариванию»

белков, нуклеиновых кислот, гликозаминогликанов (Пушкарь Н.С., Белоус А.М., 1975) и гибели определенного процента самой чувствительной популяции лейкоцитов – гранулоцитов.

Дополнительную не менее важную роль в сохранении высокого уровня лейкоцитов в функционально полноценном состоянии после отогрева играют не только криопротекторы, но и введенные в состав хладоограждающих растворов «реставрирующие» добавки. Хотя раствор №2 по большинству показателей проявил себя достоверно «хуже», чем раствор №1, уровень вышедших из холодового анабиоза жизнеспособных лейкоцитов ($79,0 \pm 0,6\%$) и нейтрофилов, способных к фагоцитозу ($66,0 \pm 4,6\%$), достаточно высок. Вероятно, этому и способствовала помощь «реставрирующего» компонента широкого спектра действия, введенного в состав раствора №2 – сукцината гидроксиметилэтилпиридина (ОМЭПС). Его антиоксидантное действие заключается в подавлении при отогреве лейкоцитов свободнорадикального окисления липидов биологических мембран, которые вместе с процессами гидролиза богатых энергией соединений могут вызывать структурные и конформационные изменения в мембранах. Обладает ОМЭПС и антигипоксическим эффектом (Девяткина Т.А. и др., 1999), снижая гипоксию клеток и поддерживая их внутриклеточный метаболизм во время замораживания и хранения (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Известно также его мембранопротекторное (взаимодействуя со структурными компонентами мембран лейкоцитов, предотвращает развитие трансмембранных дефектов) и стресс-

протекторное (повышает устойчивость клеток и их органелл к воздействию холода) действия.

В растворе №1, ввиду того, что криопротектор ГМБТОЭМ является более эффективным и универсальным, в качестве «реставрирующего» компонента было введено вещество узкого спектра действия – антигипоксикант биоэнергетической направленности фумарат натрия. Лейкоциты, в отличие от других клеток крови, обладают повышенным обменом веществ, который при умеренно-низкой температуре (-40°C) хотя и сильно 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; Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., 2007). Фумарат натрия способен предотвращать или устранять постгипоксические нарушения энергетического метаболизма, поддерживать внутриклеточный метаболизм лейкоцитов в процессе хранения и при размораживании. Взаимное дополнение эффекта криопротектора ГМБТОЭМ антигипоксикантом фумаратом натрия позволило сохранить $75,8 \pm 4,7\%$ лейкоцитов с неповрежденной плазматической мембраной, из которых $90,2 \pm 3,5\%$ - гранулоциты. При этом способность к фагоцитозу наблюдалась у $97,5 \pm 2,6$ нейтрофилов.

Наряду с криофилактическими веществами для предупреждения или сглаживания повреждающих воздействий вне- и внутриклеточного льда на биологические мембраны лейкоцитов в настоящее время применяют классические быстрые линейные и новаторские медленные нелинейные программы. Последние по доступности и высокой

эффективности прекрасно зарекомендовали себя при замораживании лейкоцитов до субумеренно-низкой (-20°C) (Сведенцов Е.П. и др., 2005) и низкой (-80°C) (Сведенцов Е.П. и др., 2008) температур. В данном исследовании была использована медленная трехэтапная нелинейная программа замораживания ядерных клеток крови до умеренно-низкой (-40°C) температуры, применение которой способствовало, во-первых, вхождению различным популяциям лейкоцитов в холодовой анабиоз постепенно на разных его уровнях (поэтому на термограмме не отмечается резкого выброса кристаллизационного тепла, не возникает рекристаллизации внутриклеточного льда и образования крупных кристаллов, травмирующих плазматические мембраны и мембраны органелл), во-вторых, замедлению процессов кристаллообразования в период фазового перехода (вода-лед). Свободная вода при этом успевает покинуть клетку, и процессы ее кристаллизации и связывания криофилактиками в основном идут за ее пределами. Более того, известно (Белоус А.М. и др., 1987), что температура и скорость охлаждения оказывают существенное влияние на процесс формирования трансмембранных дефектов. При медленном охлаждении клеточной суспензии дефекты «успевают закрываться» на каждом из этапов этого процесса, что благоприятно сказывается на сохранности клеток после отогрева.

Наконец, помимо смешивания с криофилактиками и применения нелинейной программы замораживания нами был использован третий антиповреждающий компонент – быстрый отогрев, способствующий удалению с поверхности контейнера с клеточной суспензией образующейся температурной «подушки» и, тем самым, устранению

рекристаллизации и образования крупных кристаллов льда, разрушающих как мембраны органелл, так и плазматическую мембрану клетки.

Таким образом, несмотря на учет и сведение до минимума всех неблагоприятных воздействий умеренно-низкой температуры (-40°C) на высокоорганизованные ядерные клетки крови, все же процент последних после отогрева остается различным. Это говорит о том, что основной защитой лейкоцитов от повреждающего действия холода служат криофилактические среды, что мы и подтвердили данным исследованием. Хотя композиция раствора №2 менее эффективно защищает клетки от холодового стресс-воздействия, однако она может служить альтернативой для тех научных исследований, которые по длительности не превышают 1 суток. При оптимальном сочетании ингредиентов раствора №1 он максимально эффективно защищает разнородные по структуре и функциям популяции лейкоцитов, готовых после отогрева для дальнейшего применения.

REFERENCE

- Pushkar N.S., Itkin Yu.A., Bronshtein V.L. (1976) On the problem of dehydration and intracellular crystallization during freezing of cell suspension. *Cryobiology*, **13**, 2, 147-152.
- Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. (1987) Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция. Высшая школа, Москва.
- Белоус А.М., Грищенко В.И. (1994) Криобиология, Наукова Думка, Киев.
- Вильянинов В.Н. (1973) Низкотемпературное консервирование эритроцитов под защитой комбинированного криопротектора на основе пропиленгликоля и

- диметилацетамида: Авт. ... кан-та мед. наук. Санкт-Петербург, 18-19.
- Виноград – Финкель Ф.Р., Киселев А.Е. (1970) Актуальные проблемы замораживания крови. *Пробл. гематологии и переливания крови*, **4**, 3-4.
- Гланц С. (1998) Медико–биологическая статистика, Практика, Москва.
- Гулевский А.К., Михалев О.И, Рязанцев В.В. (1987) О физических состояниях и криозащитных свойствах растворов холинхлорида. *Криобиология*, **1**, 17-21.
- Девяткина Т.А., Луценко Р.В., Важничая Е.М., Смирнов Л.Д. (1999) Вопросы медицинской химии. *Влияние мексидола и его структурных компонентов на содержание углеводов и перекисное окисление липидов при остром стрессе*, **45**, 246-249.
- Иткин Ю.А., Бронштейн В.Л., Гордиенко Е.А., Марценюк В.Ф. (1983) Консервирование клеточных суспензий. *Замораживание: факторы, механизмы и гипотезы криоповреждения биологической суспензий*, Наукова Думка, Киев, 26-34.
- Криоконсервирование клеточных суспензий (1983), под ред. Цуцаевой А.А., Наукова Думка, Киев.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. (2006) Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты, Фирма «Слово», Москва, 22-72.
- Овсянников С.Е., Мартынюк И.Н., Никитченко Ю.В., Линник Т.П. (2008) Влияние проникающих криопротекторов на интенсивность перекисного окисления липидов мембран спермиев птиц при гипотермии. *Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия (Мат-лы межд. конференции)*, Пушкино, 99.
- Пушкарь Н.С., Белоус А.М. (1975) Введение в криобиологию. Наукова Думка, Киев.
- Руководство по трансфузионной медицине (1999), под ред. Сведенцова Е.П., Киров.
- Сведенцов Е.П. (2004) К классификации разных уровней отрицательных температур, используемых для консервирования биообъектов. *Мат-лы научной сессии НИИ и ВУЗов*, Изд-во Кировского областного Бюро медицинского статистики и информатики, Киров, 117-120.
- Сведенцов Е.П., Девятьярова О.Н., Туманова Т.В., Щеглова О.О., Костяев А.А., Утемов С.В. (2005) Введение лейкоцитов в холодовой анабиоз (-20°C) по экспоненциальной программе. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **3**, 558-566.
- Сведенцов Е.П., Туманова Т.В. (2007) Функциональное состояние лейкоцитов после выхода из криоанабиоза, Изд-во УрО РАН, Екатеринбург.
- Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Семенов А.Н., Хомякова С.А., Костяев А.А., Утемов С.В. (2002) Патент на изобретение РФ № 2184449. Криозащитный раствор для замораживания лейкоцитов при умеренно-низкой температуре. Бюл.19.
- Сведенцов Е.П., Туманова Т.В., Худяков А.Н., Зайцева О.О., Соломина О.Н., Утемов С.В., Шерстнев Ф.С. (2008) Сохранение биологических мембран ядерных клеток крови при температуре -80°C. *Биологические мембраны*, **25**, **1**, 23-29.
- Смолянинова Е.И., Липник Т.Н., Гордиенко О.И. (2004) Проницаемость мембран

- ооцитов мыши для криозащитных веществ ряда диолов и амидов. *Цитология*, 46, 9, 855-856.
- Терентьева Э.И., Леонтович В.А., Шишканова З.Г. (1978) Электронная микроскопия лейкоцитов в процессе их хранения. *Пробл. гематологии и переливания крови*, 1, 28-34.
- Цуцаева А.А., Котляров А.О., Кудокоцева О.В. (2004) Механизмы индукции и репарации нелетальных криповреждений. *Цитология*, 46, 9, 879.