

ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

УДК: 57.043:612.111:599

О.Н. Денисова, Г.Ф. Жегунов

Харьковская государственная зооветеринарная академия

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

В ветеринарной практике в последние годы для лечения животных широко используют метод переливания крови. Гемотрансфузия у собак в зарубежной практике используется с 50-х годов и имеет широкие показания к применению, в частности при острой кровопотере, острой гемолитической анемии, хронической анемии, тромбоцитопении и др. Многие ветеринарные врачи используют кровь, заготовленную на цитратном буфере или “Глюгидице”. Однако такая кровь при положительных температурах может сохраняться в течение ограниченного периода времени [3]. При гипотермическом хранении ухудшаются морфофункциональные свойства клеток. Поэтому создание запасов донорской крови животных возможно лишь при долгосрочном хранении клеток в замороженном состоянии.

Целью настоящего исследования было изучение влияния криоконсервирования на эритроциты домашних животных. Объектом исследования служили эритроциты быка, лошади и собаки.

Материалы и методы

Для криоконсервирования эритроцитов животных были использованы следующие криопротекторы: глицерин 15% [1]; диметилсульфоксид 10% (ДМСО) [4]; полиэтиленоксида м.м. 1500 15% (ПЭО-1500)

[2]. Замораживание осуществляли путем погружения контейнера в жидкий азот. Отогрев после низкотемпературного хранения производили на водяной бане 42-45° С. Проникающий криопротектор удаляли серийным центрифугированием. Моделирование трансфузии осуществляли путем перенесения эритроцитов в среду с физиологической тоничностью при 37° С.

Результаты исследования

Показано, что глицерин в концентрации 15%, в отличие от ДМСО в концентрации 20%, неэффективен для защиты эритроцитов лошади, быка и собаки при быстром замораживании в жидком азоте (рис. 1). После криоконсервирования с ПЭО-1500 в концентрации 15% наблюдается минимальный уровень гемолиза для всех клеток.

Перенесение эритроцитов после криоконсервирования под защитой ПЭО-1500 и ДМСО в изотонический раствор NaCl при 37° С дает представление о стабильности клеток в физиологических условиях (модель трансфузии). Как видно из данных, представленных на рис. 2, при перенесении эритроцитов животных, криоконсервированных под защитой ДМСО, в изоосмотические условия при 37° С не выявлено достоверно значимых отличий в уровне гемолиза вплоть до 24 часов нормотермиче-

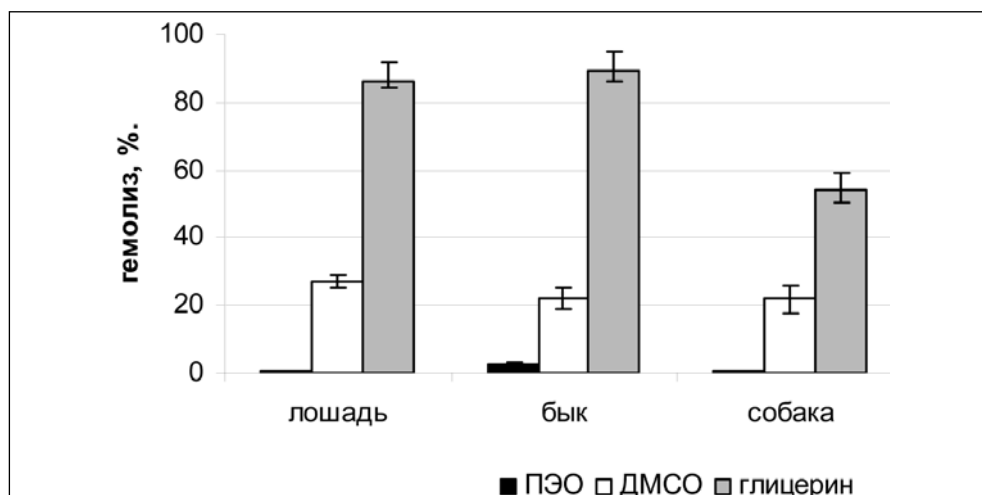


Рисунок 1. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих после замораживания-отогрева под защитой криопротекторов. Результаты представлены из 8 независимых экспериментов $\pm$ средняя ошибка ($M \pm m$)

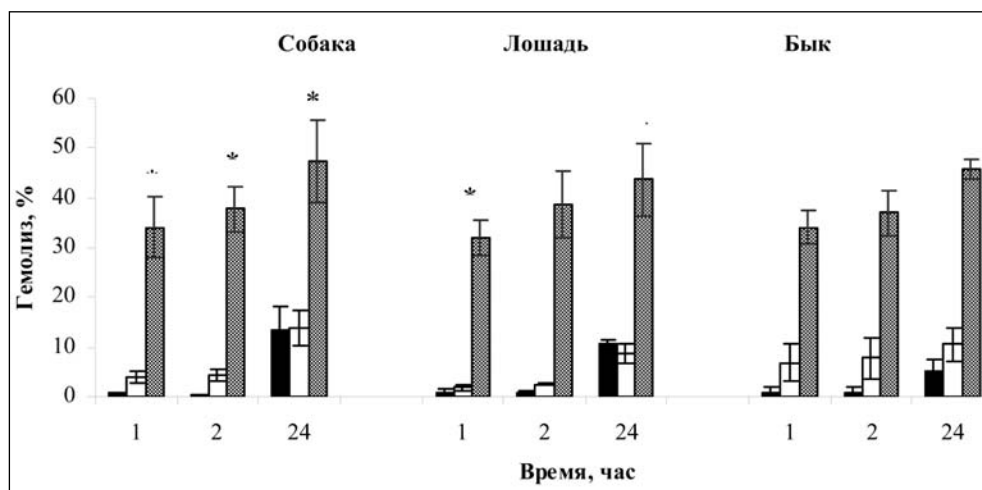


Рисунок 2. Уровень гемолиза деконсервированных эритроцитов после моделирования трансфузии: ■ – контрольные клетки, □ – клетки, криоконсервированные с ДМСО, ▨ – клетки, криоконсервированные с ПЭО -1500. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ средняя ошибка ($M \pm m$) из 8 независимых экспериментов; * - достоверно относительно контроля; $p < 0,05$

кой инкубации по сравнению с контролем. Перенесение эритроцитов лошади, быка, собаки после их криоконсервирования под защитой ПЭО-1500 в изотонический раствор NaCl при 37° С сразу ведет к резкому возрастанию гемолиза в клеточной суспензии, что свидетельствует о повреждении клеток. Отличия в стабильности эритроцитов животных, криоконсервированных с ПЭО-1500 от контрольных и замороженных в присутствии ДМСО клеток отмечаются уже в течение первого часа. С течением времени стабильность таких клеток продолжает падать у всех животных. При этом интенсивность гемолиза продолжает нарастать в течение 24 часов, увеличиваясь с 32–

36% в первый час инкубации до 50% по истечении времени контролирования.

Разная стабильность эритроцитов после низкотемпературного хранения под защитой ПЭО-1500 в отличие от ДМСО, возможно, связана с разным механизмом действия криопротекторов, использованных для защиты клеток при криоконсервировании, что проявляется после 24 часов инкубации.

Таким образом, показано, что глицерин не способен обеспечить защиту эритроцитов исследованных животных при низкотемпературном консервировании. Высокая сохранность клеток достигается использованием ДМСО и ПЭО-1500. Эрит-

роциты, криоконсервированные с ДМСО, в сравнении с ПЭО-1500, проявляют высокую

устойчивость (на уровне контроля) в модели трансфузии.

SUMMARY

The viability of horse's, bull's, dog's erythrocytes after cryopreservation with cryoprotectants have been studied. The results obtained in the work testify to the fact, that DMSO is the most efficient cryoprotectant during cryopreservation for horse, bull and dog erythrocytes. PEO-1500 is capable to preserve cells during cryopreservation, but after transferring such frozen-thawed cells under physiological conditions they undergo damages.

Литература

1. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. М.: Медицина, 1983. 96 с.
2. Бабійчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М. Новий метод криоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія. 2000, Т. 1, № 1. С. 296–298.
3. Мокеев И. Н. Инфузионно-трансфузионная терапия: Справочник. М. 1998. 232 с.
4. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. Киев: Наукова думка, 1978. 204 с.

С.И. Дрокин, Б.Б. Дзюба, Т.М. Гурина, Е.А. Гордиенко, П. Тодоров

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

ОСОБЕННОСТИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ СУСПЕНЗИЙ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ОСМОТИЧЕСКИ НЕАКТИВНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

При разработке методов криоконсервации спермы рыб разные авторы использовали различную степень ее разбавления криозащитной средой. Обычно используется разведение 1:1, однако имеются публикации в которых сперму разводили 1:3 [4], 1:5 [3] или даже 1:9 [5]. Степень разведения вероятно подбиралась эмпирически и до настоящего времени нам не известны аргументированные объяснения зависимости выживания клеток после криоконсервации от их концентрации в суспензии.

Известно, что при добавлении проникающего криопротектора к клеточной суспензии по истечении некоторого промежутка времени его концентрация вне и внутри клеток становится одинаковой [1]. Однако, при этом не учитывается, что клетки могут содержать осмотически неактивные внутриклеточные структуры, которые недоступны для криопротектора в качестве растворителя, и, если концентрация этих клеток достаточно высока, то наличие осмотически неактивных внутриклеточных структур может существенно повлиять на осмотическое давление окружающей клетки среды и температуру ее кристаллизации.

Процесс перераспределения проника-

ющего через клеточную мембрану криопротектора между клеткой и окружающей ее криозащитной средой описывается модифицированным уравнением [2]:

$$\frac{d}{dt} n^{in} = -\frac{1}{y \cdot \alpha} [\gamma k (n^{in} - n^{out}) + \sigma n^{in} \frac{dV}{dt}], \quad (1)$$

где n^{in} , n^{out} – молярная концентрация криопротектора в клетке и во внеклеточной среде соответственно, t – время, y – относительный объем клетки (отношение текущего объема клетки V к его начальному значению), α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных компонентов, γ – поверхностно-объемное отношение клетки, k – коэффициент проницаемости клеточной мембраны для криопротектора, σ – коэффициент отражения клеточной мембраны для молекул криопротектора. Если в криозащитный раствор с концентрацией криопротектора

$$n_s = \frac{N_s}{V_s}$$

(N_s – количество молей криопротектора в этом растворе, V_s – объем криозащитного раствора) внести N клеток с изотоническим объемом V_0 , то по истечении промежутка времени порядка $(\gamma k)^{-1}$ концентрации криопротектора вне и внутри клеток становятся одинаковыми и равными: