

**МОДЕЛЬНЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ ПРОЦЕССА  
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ**

*Кузнецов О.Р., Стрилец О.П., \*Шпакова Н.М.*

Кафедра биотехнологии Национальный фармацевтический университет,  
г. Харьков, Украина

\*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
г. Харьков, Украина

Эритроцит представляет собой высокоспециализированную клетку крови, основной функцией которой является транспортирование кислорода ко всем органам и тканям, а также удаление углекислого газа из организма. Эффективность газообмена обеспечивается большой площадью поверхности эритроцита и эластичностью его мембраны, что позволяет клетке проходить через узкие капилляры, размеры которых меньше размера самой клетки. Кроме того эритроциты содержат специальную ферментативную систему, работа которой защищает от негативного действия активных форм кислорода [1]. Интерес к эритроциту обусловлен важностью и других выполняемых им функций, таких как буферная, питательная, защитная, гуморальная, детоксикационная [3].

При травмах и различных заболеваниях пациенты нуждаются в переливании крови или ее компонентов, поскольку гемотрансфузия является высокоэффективным методом интенсивной терапии. Потребность в трансфузии гемокомпонентов возрастает при массовых поражениях и катастрофах, а также при выполнении миротворческих или военных операций. Хранение эритроцитов необходимо для последующего производства реагентов для иммуногематологических исследований. В настоящее время стволовые клетки, полученные из пуповинной крови, используют в терапии и для трансплантации при лечении более 85 заболеваний, включая лейкозы, рак костного мозга, лимфомы и анемии. Именно поэтому проблема продолжительного хранения пуповинной крови является актуальной и своевременной.

Использование крови, которая была заготовлена на цитратратном буфере или гемоконсерванте «Глюгидир» и сохранялась при положительной температуре (+4°C), ограничено временем, поскольку клетки в этих условиях быстро теряют свои функциональные и морфологические свойства. В настоящее время с целью долгосрочного хранения клеток и создания запасов донорской крови используют криоконсервирование биологических объектов. Криоконсервирование – это технология сохранения биологических объектов путем их охлаждения до температур, при которых прекращаются все биологические процессы. Поскольку при температуре -196°C происходит временная остановка обменных процессов, то клетки во время хранения в указанных условиях не повреждаются [5].

Основная проблема, возникающая при криоконсервировании, заключается в том, чтобы сохранить препарат от криоповреждения в процессе замораживания и последующего отогрева [5]. Процесс кристаллизации водной

фазы, происходящий при замораживании, приводит к повреждению, о котором можно говорить, как о специфическом, а нарушение, обусловленное действием сопутствующих факторов (изменение осмолярности, ионной силы, рН среды и др.), характеризуется неспецифичностью.

Поскольку криповреждение является суммарным результатом действия различных факторов, для оценки криобиологических процессов является более важным выяснение роли того или другого фактора по степени его вклада в общий уровень повреждения, а не по уровню его специфичности. Действие факторов криповреждения может быть оценено в «модельных» экспериментах, которые проводятся при положительных температурах, когда отсутствует кристаллизация водной фазы [4].

В качестве одного из основных факторов повреждения биологического материала при замораживании рассматривают гипертонию, поскольку в процессе вымораживания свободной воды происходит значительное концентрирование внеклеточной среды [5]. Поэтому для оценки вклада гипертонического фактора в общее криповреждение клеток используют модельный подход – гипертонический шок, который осуществляют перенесением эритроцитов в гипертоническую среду при положительных температурах.

Для оценки состояния эритроцитов в условиях действие стрессовых факторов используют ряд методов, к которым относятся спектрофотометрия (для определения содержания гемоглобина, вышедшего из эритроцитов в супернатант), световая микроскопия (для регистрации изменения формы и объема эритроцитов), ионометрия, атомно-абсорбционная спектрофотометрия и капиллярный электрофорез (для определения содержания ионов калия и натрия), микрогематокритный метод (для определения гематокрита эритроцитов).

При изучении влияния гипертонического шока на эритроциты млекопитающих (человек, бык, кролик, крыса, лошадь, собака) была выявлена их различная устойчивость к действию стрессового фактора [2]. Для характеристики полученных концентрационных зависимостей гипертонического гемолиза были выбраны 2 показателя: это уровень гемолиза эритроцитов в 4,0 моль/л NaCl и величины пороговых концентраций NaCl, т.е. максимальные концентрации солевого раствора, при которых уровень гемолиза эритроцитов не превышает 10%-ого значения. По этим показателям самыми устойчивыми являются клетки кролика, в то время как эритроциты человека и быка весьма чувствительны к действию высококонцентрированных солевых сред.

Для выяснения причин различной чувствительности клеток млекопитающих к гипертоническому шоку была проведена оценка связи между температурно-осмотическими показателями эритроцитов разных видов млекопитающих и структурно-функциональными характеристиками этих клеток с помощью корреляционного анализа с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена [4]. Результаты, полученные в этой работе, указывают на важность воды в развитии гипертонического шока эритроцитов

млекопитающих. Статистически значимая положительная сильная связь установлена между значениями пороговых концентраций хлорида натрия при гипертоническом шоке эритроцитов и величинами коэффициентов диффузионного транспорта воды, содержанием внутриклеточной воды, а гидрофобность гемоглобина отрицательно коррелирует с уровнем гемолитического повреждения клеток в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl [4].

Таким образом, гипертонически устойчивые клетки на начальных этапах гипертонического шока характеризуются высоким содержанием внутриклеточной воды, а их мембраны – высоким значением диффузионного транспорта воды. Кроме того, гемоглобин этих клеток характеризуется низкой гидрофобностью, что свидетельствует в пользу более высокой его способности связывать внутриклеточную воду. Это клетки кролика и крысы [2, 4].

В момент внесения эритроцитов в гипертоническую среду происходит выход воды из клеток. Обезвоживание сопровождается сильным сжатием эритроцитов и значительной деформацией их плазматической мембраны, в результате чего зарождаются трансмембранные дефекты, которые мгновенно эволюционируют до размера гемолитической поры. Исходя из того, что гипертоническое повреждение клеток выражено в меньшей степени в том случае, когда процесс обезвоживания происходит очень быстро, можно полагать, что гемолитическое повреждение происходит в неравновесных условиях выхода воды из клетки. Чем быстрее завершается процесс выхода внутриклеточной воды, тем благоприятнее судьба клеток, поскольку сокращается время формирования и эволюции трансмембранной поры.

Следует отметить, что гипертоническая чувствительность эритроцитов разных видов млекопитающих зависит от температуры: при 37°C клетки легче повреждаются, чем при 0°C [4]. Это свидетельствует о вовлечении липидного компонента эритроцитарной мембраны в механизм повреждения клеток.

#### **Список литературы**

1. Гильмутдинов Р.Я. Сравнительная гематология животных / Р.Я. Гильмутдинов, Р.Г. Ильязов, А.В. Иванов. – Казань : ФЭН, 2005. – 288 с.
2. Ершов С. С. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды / С.С. Ершов, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51–57.
3. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 3 (73). – С. 334–354.
4. Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: спец. 03.00.19 – криобіологія / Н.М. Шпакова. – Харків, 2014. – 44 с.
5. Life in the frozen state / edited by B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson. – Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. : CRC Press, 2004 – 672 p.