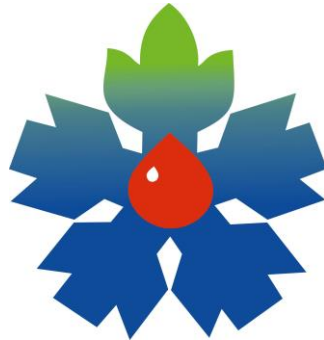


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**



**МЕТОДИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ
ТВАРИН**

Методичні рекомендації для самостійної роботи
аспірантів 2 курсу
спеціальність 091 Біологія
галузь знань 09 Біологія
Дисципліна «Кріоветеринарія»

Харків 2022

Рецензенти:

А.М. Компанієць – доктор медичних наук, професор; зав. лабораторії кріопротекторів, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

А.П. Герілович – доктор ветеринарних наук, професор, членкор. НААН України, старший науковий співробітник НДВ молекулярно-генетичних досліджень, Державний науководослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Затверджено до друку рішенням освітньо-наукової секції вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 10 від 25.11.2022 р.)

Методи кріоконсервування еритроцитів тварин: Методичні рекомендації для самостійної роботи аспірантів 2 курсу (галузь знань 09 Біологія, спеціальність 091 Біологія) з дисципліни «Кріоветеринарія» / Денисова О.М., Тихвинська О.О., Шпакова Н.М., Бабійчук Л.О., Божкова Ю.О./ [Електронний ресурс] – Х.: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2022. – 25 с.

У методичних рекомендаціях розглядаються питання щодо довгострокового зберігання еритроцитів різних видів тварин із застосуванням технології низькотемпературного консервування, що є одним із актуальних напрямків розвитку трансфузійної ветеринарної медицини. Розвиток таких технологій низькотемпературного консервування дає можливість створити банк крові тварин і завжди мати запас кріоконсервованих клітин різних порід тварин та різних груп крові.

Для здобувачів вищої освіти на третьому освітньо-науковому рівні (доктор філософії).

ЗМІСТ

<i>Завдання кріоконсервування</i>	4
<i>Особливості метаболізму еритроцитів тварин</i>	4
<i>Особливості будови мембран еритроцитів тварин</i>	7
<i>Кріопошкодження еритроцитів</i>	14
<i>Кріопротектори</i>	16
<i>Методи кріоконсервування еритроцитів тварин</i>	17
<i>Висновок</i>	20
<i>Контрольні питання</i>	22
<i>Література</i>	23

1. Завдання кріоконсервування

Кріоконсервування – це процес збереження біологічних структур і функцій живих систем за допомогою заморожування та зберігання при ультранизьких температурах. Нижче -150°C біологічно значущі реакції та зміни фізико-хімічних властивостей у системах відсутні. Фізіологія еритроциту при кріоконсервуванні, включаючи структуру гемоглобіну і мембрани та енергетичний потенціал клітини, залишається у незміненому стані. Кріоконсервування еритроцитів є технологією, що дозволяє забезпечувати *ex vivo* біологічні функції клітини та зберігати її тривалий час.

Необхідність кріоконсервування еритроцитів тварин пояснюється величезною клінічною потребою у переливанні компонентів крові при різних захворюваннях. Дуже часто виникають ситуації, пов'язані з необхідністю термінового проведення гемотрансфузії, та ветеринарні лікарі змушені шукати донора, зокрема при гострій втраті крові тваринами, різних анеміях, тромбоцитопенії. Гемотрансфузія є вискоелективним методом інтенсивної терапії, незамінним при лікуванні важких форм бабезіозу та ряду інфекційних захворювань, таких як чума та інфекційний ентерит. Саме тому в даний час інтерес до кріоконсервування еритроцитів тварин зростає. Однак довгострокове зберігання еритроцитів тварин є недостатньо розробленою технологією, ніж заморожування еритроцитів людини. Розвиток таких технологій дає можливість створити банк крові тварин та завжди мати запас кріоконсервованих клітин різних порід тварин та різних груп крові. З іншого боку, вивчення реакції клітин на дію факторів низькотемпературного впливу дасть можливість зрозуміти загальнобіологічні закономірності поведінки клітин за умов стресу та розробити більш досконалі протоколи для низькотемпературного зберігання еритроцитів.

2. Особливості метаболізму еритроцитів тварин

Еритроцит являє собою метаболічно активну високоспеціалізовану клітину, в якій висока спеціалізація призвела до змін структури та метаболізму. Максимальна ефективність здійснення зрілим еритроцитом своєї основної функції, а саме постачання тканин киснем, забезпечується наявністю гемоглобіну, унікальною формою клітини, спрощенням метаболічної системи при збереженні єдиного метаболічного процесу –

утилізації 80% глюкози через гліколіз та 15% через пентозофосфатний шлях. Гемоглобін здатний транспортувати у 100 разів більше кисню порівняно з плазмою. Унікальна форма двояковогнутого диска є оптимальною для мікроциркуляції еритроциту та обміну газів через його мембрану. Спрощення структури та метаболічної системи спостерігається внаслідок відсутності внутрішньоклітинних органел (ядра, мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму) та втратою відповідних їм функцій (здатності до синтезу білків, ліпідів, пуринів, до окисного фосфорилування).

Глюкоза є субстратом для гліколізу еритроцитів усіх видів ссавців, крім клітин свиней. Еритроцити свиней не здатні утилізувати глюкозу, тому що у них відсутній транспортер глюкози. Для цього виду еритроцитів важливим субстратом є інозит. Швидкість перетворення глюкози у різних видів тварин різна та становить для еритроцитів людини 1,18–1,59; для собаки – 2,24–2,99, для коня ~0,64, бика ~ 0,56 мкмоль/година/мл. У клітині глюкоза перетворюється на глюкозо-6-фосфат в гексокіназній реакції. Активність гексокінази також видоспецифічна та становить для еритроцитів людини ~178, собаки ~14, коня ~48,4, бика ~35,7 мкмоль/хв/100г Нь. Швидкість гліколізу в еритроцитах людини не лімітується швидкістю гексокіназної реакції, проте вона є більш значущою для ссавців із низькою гексокіназною активністю. Глюкозо-6-фосфат метаболізується у гліколізі або пентозофосфатному шляху.

Еритроцит є єдиною клітиною, що містить виключно високі концентрації 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ), синтез якого відбувається через двоферментний обхідний шлях – цикл Рапопорта-Люберінга, що виключає АТФ-генеруючий етап на рівні фосфогліцераткінази. На 2,3-ДФГ–шунт припадає 25–50% загального потоку гліколітичних субстратів. Підтримка високого пулу цієї сполуки (3/4 загальної кількості органічних фосфатів клітини) на збиток енергетичному потенціалу обумовлено тим, що 2,3-ДФГ, будучи головним фізіологічним регулятором спорідненості гемоглобіну до кисню, фактично забезпечує виконання еритроцитом своєї основної функції.

В енергетичному відношенні утворення 2,3-ДФГ менш ефективно, так як призводить до утворення лише однієї молекули АТФ замість двох молекул, що накопичуються при основному шляху гліколізу. Однак роль 2,3-ДФГ не обмежується участю у резервному механізмі ресинтезу АТФ. Як уже зазначалося, основне значення цієї сполуки полягає у регуляції

спорідненості гемоглобіну до кисню. При збільшенні концентрації 2,3-ДФГ в еритроциті зменшується ступінь спорідненості гемоглобіну до кисню; при цьому більша кількість кисню звільняється з оксигемоглобіну і передається тканинам. Рівень 2,3-ДФГ збільшується при захворюваннях, пов'язаних з гіпоксією, а також при стресі, що проявляється у зменшенні спорідненості гемоглобіну до кисню та обмеження гіпоксії. Крім того, 2,3-ДФГ розглядається як метаболіт, що підвищує «адаптивні» можливості організму в умовах патологічних та стресових станів (анемія, ацидоз, шок, хвороби серця, хронічні хвороби легень та ін.). Ця сполука бере активну участь у підтриманні осмотичного та іонного балансу клітин, регулює спільно з гемоглобіном та білками цитоскелета нормальний вміст води у клітині та її об'єм.

2,3-ДФГ пов'язаний з метаболізмом АТФ, так як є інгібітором АМФ-дезамінази, фосфорибозил-пірофосфатсинтетази та деяких інших ферментів вуглеводного обміну. У разі виснаження рівня АТФ у клітині, 2,3-ДФГ є резервним джерелом цієї макроергічної сполуки. Вважають, що АТФ прямо чи опосередковано регулює підтримання нормальної двояковогнутої форми еритроцита та її здатність до деформованості, тобто концентрації АТФ та 2,3-ДФГ контролюють не тільки структурну організацію білків та білкових комплексів мембрани, а й латеральну рухливість глікопротеїдів у мембрані, а також динаміку цитоскелета.

Еритроцити ссавців можуть бути поділені на дві групи. Одні з них містять високий рівень 2,3-ДФГ і мають високу спорідненість гемоглобіну до кисню (еритроцити людини, коня, собаки, верблюда). Інші (еритроцити жуйних, жирафів, кішок, гієн) мають дуже низький рівень 2,3-ДФГ, що відбивається у зниженій спорідненості гемоглобіну до кисню. У жуйних, в на відміну від інших видів ссавців, низький вміст 2,3-ДФГ фізіологічно обумовлено укороченням N-термінального кінця β -ланцюга гемоглобіну, де знаходиться сайт для зв'язування 2,3-ДФГ.

Концентрація АТФ та 2,3-ДФГ в еритроцитах різних видів тварин видоспецифічна. Вміст АТФ в еритроцитах людини – 90–150, коня – 19–28, бика – 20–63, собаки – 40–61 мкмоль/100 г Нв. Концентрація 2,3-ДФГ в еритроцитах людини складає 400–630, коня – 500–800, бика – 1,34, собаки – 500–800 мкмоль/100 г Нв.

У пентозофосфатному шляху утворюється НАДФН, який постачає H^+ для регенерації відновленого глутатіону (GSH) з глутатіон-дисульфідом (GSSG) за допомогою глутатіон-редуктази. Відновлений глутатіон є

найбільш важливий антиоксидант еритроцитів, він є коферментом при відновленні метгемоглобіну в функціонально активний гемоглобін.

3. Особливості будови мембран еритроцитів тварин

В основі еритроцитарної мембрани лежить складна структура, що складається з безлічі різноманітних компонентів, які пов'язані між собою (Рис. 1). У структурному відношенні вона являє собою ліпідний бішар з вбудованими в нього білками та цитоскелетною мережею. Основу мембрани складають такі класи хімічних сполук: ліпіди, вуглеводи, білки, вода. Ліпіди в мембрані представлені у вигляді двох фосфоліпідних моношарів, де полярні головки ліпідних молекул спрямовані у поза- та внутрішньоклітинне середовище, а гідрофобні вуглеводневі ланцюги розташовані всередині мембранного бішару. Ліпіди у бішарі розподілені асиметрично. Фосфатидилхолін та сфінгомієлін, які є нейтральними молекулами, розташовані, переважно, у зовнішньому моношарі, а негативно заряджені молекули фосфатидилсерину, фосфатидилетаноламіну та мінорного фосфоліпиду фосфатидилінозита – у внутрішньому моношарі. Однак, невелика частина (біля 20%) фосфатидилетаноламіну знаходиться у зовнішньому бішарі ліпідів.

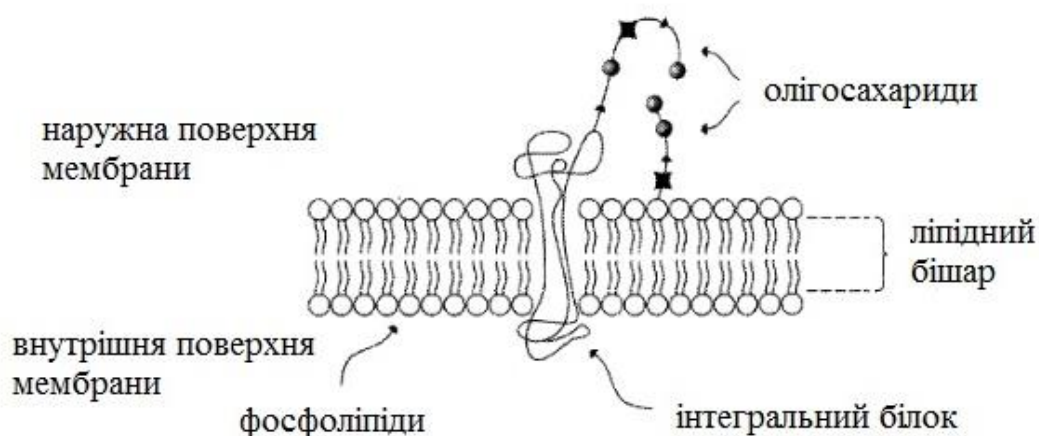


Рис. 1. Структура мембрани еритроцитів

Найбільш широко представленим з усіх мембранних фосфоліпідів у еритроцитах ссавців є фосфатидилхолін. В еритроцитах собаки, коня та людини його вміст складає 46,9%; 42,4%; 29,3%; відповідно. У той час як у мембрані еритроцитів бика фосфатидилхолін присутній у слідових

кількостях. Особливістю еритроцитів жуйних є також те, що фосфатидилетаноламін знаходиться у внутрішньому моношарі мембрани. Еритроцити жуйних містять високий рівень сфінгомієліну. За зменшенням вмісту сфінгомієліну у фракції фосфоліпідів еритроцитарних мембран ссавців можна розмістити до ряду: бик – 46,2 %; людина – 25,5 %; кінь – 13,5%; собака – 10,8%. Хоча в ряді ссавців змінюється відносний вміст фосфатидилхоліну та сфінгомієліну, їх сумарна частка (а, отже, відношення кислих фосфоліпідів до нейтральних) залишається приблизно постійною.

Обидва моношари мембрани еритроцитів містять холестерин. Він обумовлює упаковку, динамічність ліпідних молекул, текучість ліпідного бішару. Білки у ліпідному матриксі займають переважно безхолестеринові області, а введення холестерину в шар, що оточує мембранозв'язані ферменти, пригнічує їх активність. Холестерин в еритроцитах собаки становить 29,5 %; коня – 28,6%; бика – 28,8 % від загальної кількості ліпідів. Загальне молярне співвідношення холестерину до фосфоліпідів в еритроцитарній мембрані становить приблизно 0,8 для людини, 0,92 для бика та коня, 0,96 для собаки.

Крім цього, в еритроцитах вказаних тварин спостерігають варіації по спектру та розподілу жирних кислот, що входять до складу ефірів холестерину, тригліцеридів, фосфоліпідів, та фракції вільних жирних кислот (Табл. 1). В еритроцитах коня три жирні кислоти (C16:0, C18:0, C18:1) знайдені в рівних кількостях та становлять 72,17 % від загальної кількості, причому насичені жирні кислоти становлять 67,2%. Еритроцити собаки мають низький вміст C18:2 та високий C20:4, і на відміну від клітин людини мають низький зміст C22:6. В еритроцитах коня у зовнішньому моношарі мембрани присутній 60% фосфатидилхоліну. Головним різновидом цього класу фосфоліпідів є 1-пальмітоїл-2-олеоїл- та 1-пальмітоїл-2-ліноліоїлфосфатидилхолін, в обмеженій кількості присутній також 1,2-дипальмітоїлфосфатидилхолін. При збільшенні вмісту останнього до 20 % збільшується ймовірність осмотичного пошкодження еритроцитів та спостерігаються зміни форми у бік ехіноцитозу. При збільшенні вмісту 1-пальмітоїл,2-арахідоноїлфосфатидилхоліну як в еритроцитах людини, так і клітинах коня спостерігається зменшення осмотичної пошкоджуваності, та зменшується ймовірність появи стоматоцитів. Ці спостереження показують, що структура еритроцитарної мембрани та загальна дискоцитна форма клітини оптимально

стабілізується різновидами фосфатидилхоліну, що містять насичені, моно- та диненасичені жирні кислоти.

Таблиця 1. Характеристика ліпідного складу мембран еритроцитів

Фракція	Кінь	Бик	Собака	Людина
Ненасичені жирні кислоти (моль % від суми жирних кислот та сфінгозину)	62,4	49,4	51,2	45,6
Холестерин (% всіх ліпідів мембрани)	28,6	28,8	29,5	30
Молярне співвідношення холестерину до фосфоліпідам	0,92	0,92	0,96	0,8
Молярне співвідношення фосфатидилхоліну до сфінгомієліну	3,14	–	4,34	1,04
Індекс подвійних зв'язків для всіх ліпідів мембрани	1,12	1,01	1,32	1,44

Клас вуглеводів представлений гліколіпідами та глікопротеїнами. Вуглеводні ділянки даних молекул, що локалізовані на зовнішній поверхні мембрани, відповідальні за адгезивні властивості клітин та формують глікоколікс. Багато хто з них є специфічними рецепторами для зв'язування різних регуляторів, антитіл, вірусів. Наявність вуглеводних ланцюгів у глікоколіксі визначають негативний заряд поверхні еритроцитів.

Мембранні білки можна умовно розділити на інтегральні та периферичні (Табл.2). Інтегральні білки тією чи іншою мірою занурені в ліпідний бішар. Для них характерний високий вміст неполярних амінокислотних залишків, за допомогою яких вони утримуються в мембрані за рахунок сил гідрофобної взаємодії з жирнокислотними ланцюгами фосфоліпідного бішара. Більшість гідрофобних амінокислот в поліпептидному ланцюзі інтегрального білка структурована у формі α -спіральної ділянки, що пронизують товщу ліпідного бішару, часто неодноразово. Периферичні білки, на відміну від інтегральних, слабо пов'язані з мембранним матриксом та легко видаляються з нього. За амінокислотним складом вони нагадують звичайні «водорозчинні». Такі

білки утримуються в мембрані відносно слабкими нековалентними зв'язками (переважно електростатичними), не вступаючи з ліпідами в гідрофобні взаємодії. За своїми функціями вони можуть бути поділені на регуляторно-сигнальні та структурно-каркасні.

До цитоплазматичної сторони мембрани прилягають особливим чином організовані периферичні білки, які складають цитоскелет еритроцитів (Табл. 2). Він представляє собою білкову мережоподібну структуру, розташовану під клітинною мембраною, та грає значну роль у визначенні й підтримці форми еритроцитів, їх деформованості, а також визначає механічні властивості мембрани. Мембранний скелет містить 76 % спектрину, 5 % актину, 5 % білка смуги 4.1 (за масою) та невелику кількість інших білків.

Таблиця 2. Характеристика білків мембран та цитоскелета еритроцитів

Білкові смуги електрофоретичних доріжок	Назва білка	Функція білків
1	2	3
Білок смуги 1	Спектрин	Основний білок цитоскелета. Утворює двовимірну мережу, до якої кріпляться актинові олігомери.
Білок смуги 2	Анкірін	Білок цитоскелета. Здійснює зв'язок цитоскелета з мембраною через білок смуги 3.
Білок смуги 3	Аніонтранспортний білок	Інтегральний білок мембрани еритроцитів. Бере участь у забезпеченні аніонного транспорту, у зв'язуванні цитоскелетного каркасу з мембраною.
Білок смуги 4.1	Аддуцін	Забезпечує стабілізацію мембрани, що закріплює зв'язок спектрину з актином.
Білок смуги 4.2	Паллідін	З'єднується з цитоплазматичним доменом білка смуги 3, анкіріном, спектрином та білком смуги 4.1

1	2	3
Білок смуги 4.5	-	Не відома
Білок смуги 4.9	-	Стабілізує взаємодії спектрину з актином і впливає на ступінь полімеризації спектрину.
Білок смуги 5	Актин	Утворює разом із спектрином та білком смуги 4.1 цитоскелет еритроцитів.
Білок смуги 6	Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа	Фермент гліколізу, приймає участь у регуляції окислення гемоглобіну.
Білок смуги 7	Тропоміозин, тропомодулін	Беруть участь у латеральній стабілізації мономерів актину, розташовуючись у борозенках двоспірального філаменту.
Білок смуги 8	Глутатіон-S-трансфераза	Елемент антиоксидантної системи клітини. Руйнує перекис водню, подібно каталазі.

Цитоскелет з'єднується з еритроцитарною мембраною за допомогою двох типів «вертикальних» зв'язків: перший включає β -спектрин, анкірін та білок смуги 3, другий – білок смуги 4.1, глікофорин і спектрин/актин. Зв'язок білок смуги 3 – анкірін – спектрин є визначальним для механічної міцності мембрани (Рис. 2).

Молекулярна маса, відносні розміри, амінокислотні послідовності мембранних цитоскелетних компонентів є видоспецифічними, хоча в загальному плані будови та функціях – подібні.

Аналіз мембранних білків еритроцитів ссавців за допомогою електрофорезу показав деякі відмінності. Головні мембранні білки, що включають смуги 1, 2, 3 і 5, еритроцитів коня, бика, собаки та людини, мають майже ідентичні молекулярні маси. При цьому дві окремі смуги 4.1 та 4.2 добре виражені у еритроцитів людини, бика та собаки, тоді як білок смуги 4.2 у мембранах еритроцитів коня відсутній. Останній розглядається як компонент системи стабілізації еритроцитарних мембран, і дефіцит цього білка зазвичай характеризується сфероцитозом і збільшеною

«крихкістю» мембрани. Однак, еритроцити коня, позбавлені білка смуги 4.2, як відомо, мають високу тенденцію до формування ехіноцитів. Білок смуги 6 виявлено в еритроцитах людини, але він відсутній в клітинах коня. В еритроцитах коня у більшій кількості присутні білки смуги 4.5 та 4.9.

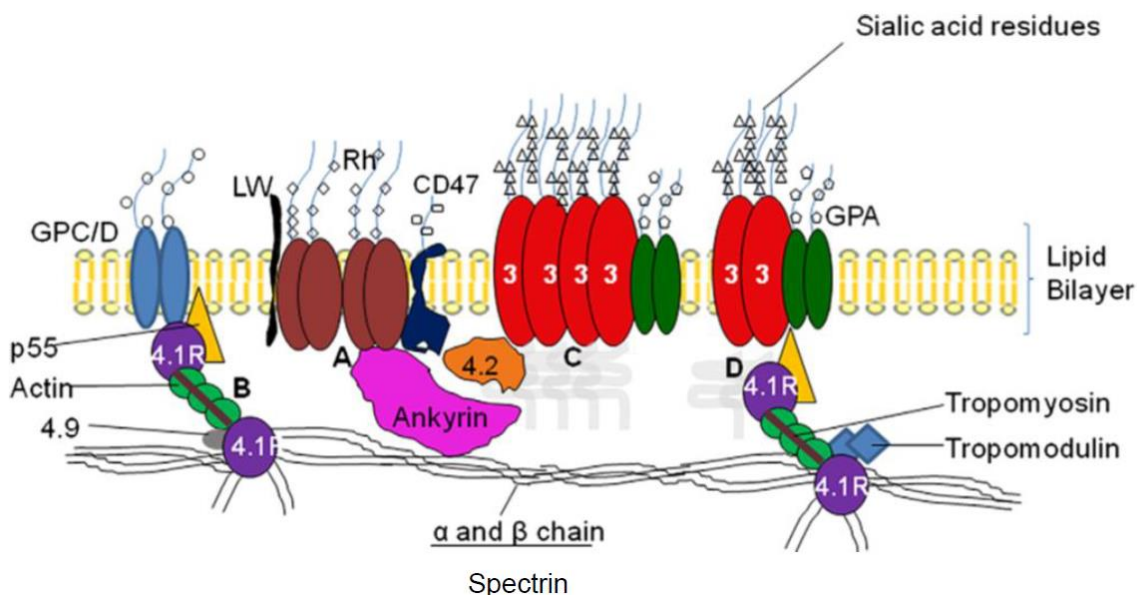


Рис. 2. Спрощена схема будови мембрани еритроцитів. (A) Rh - комплекс; (B) комплекс білка смуги 4.1; (C) і (D) макрокомплекс білка смуги 3 ((C) тетрамерна форма білка смуги 3 та (D) димерна форма білка смуги 3) (L. Bordin et al., 2002)

Таким чином, очевидно, що незважаючи на єдиний принцип будови мембран та цитоскелета еритроцитів різних тварин, вони суттєво можуть відрізнятися особливостями молекулярної організації та властивостей. Ці особливості вимагають розробки спеціальних методів для кріоконсервування еритроцитів різних видів тварин.

При циркуляції крові еритроцити, стикаючись один з одним та стінками судин, можуть приймати найрізноманітніші форми. За відсутності зовнішніх механічних впливів рівноважною формою є двояковогнутий диск, тобто еритроцити є «дискоцитами». Якщо їх відокремити від плазми, то залежно від середовища та умов, в які вони переводяться, клітини здатні набувати різних рівноважних форм (Рис. 3).

Після інкубації еритроцитів у умовах, що призводять до зниження концентрації АТФ у клітинах, спостерігається поява на них «шипів» у вигляді «тупих» конусів (кренування клітин) та відбувається загальна трансформація з диска на сферу. Зазвичай на поверхні еритроциту утворюється 20-30 розподілених випадковим чином шипів, що мають подібні розміри. Креновані еритроцити називаються ехіноцитами.

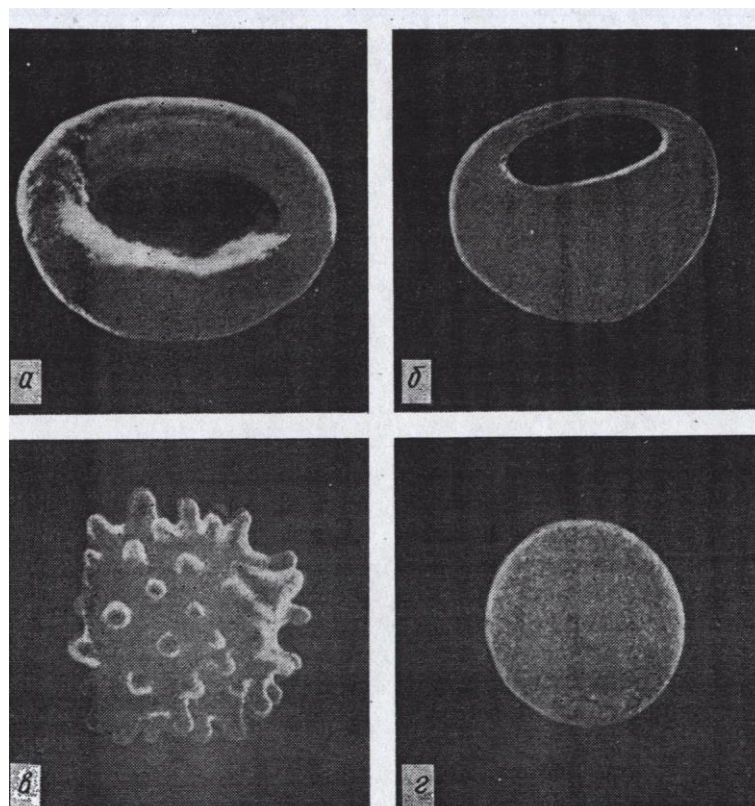


Рис. 3. Форми еритроцитів людини за даними скануючої електронної мікроскопії: а – дискоцит, б – стоматоцит, с – ехіноцит, г – сфероцит

Утворення ехіноцитів спостерігається при ряді хімічних впливів на дискоцити: у присутності аніонних детергентів, негативно заряджених анестетиків, у разі підвищення рН середовища. Після переведення клітин у фізіологічні умови вони відновлюють форму диска. У присутності позитивно заряджених речовин (катионних детергентів, локальних анестетиків) або при зниженні рН еритроцити набувають форми однобічно увігнутих дисків – стоматоцитів. Ці зміни також оборотні. Після тривалого витримування еритроцитів у нефізіологічних умовах відбувається поступова трансформація від ехіноцитів або стоматоцитів до сферичної

формі. Сфероцити представляють передгемолітичний стан клітин і через короткий проміжок часу спостерігається їхній гемоліз. За деяких захворюваннях еритроцити приймають патологічні форми, які не зустрічаються *in vitro* (акантоцити, кодоцити, кератоцити, тороцити та ін.).

Еритроцити ссавців, як і еритроцити людини, є клітинами, що характеризуються формою двояковогнутого диска. Діаметр, площа поверхні та об'єм еритроцитів мають видові відмінності. Так, відомо, що розміри еритроцитів коня та бика менші, ніж еритроцитів людини та собаки і становлять ~5,5 нм; ~ 5,7–5,8 нм; ~8,0 нм; ~7,2–7,6 нм відповідно; об'єм еритроцитів людини, собаки, бика та коня становить 90, 70, 50, 45 мкм³ відповідно, а площа поверхні – 98,4; 82,7; 60,7; 54,6 мкм² відповідно. Число еритроцитів в одиниці об'єму крові у цих тварин також варіює. Якщо в людини 1 мм³ міститься приблизно 5,0 млн. еритроцитів, то в собаки – 5,5–8 млн., у коня – 6–9 млн., у бика 5–7 млн. клітин. Велика загальна поверхня еритроцитів, їх поверхнево-об'ємне співвідношення та своєрідна форма забезпечують ефективне виконання основних їх функцій – транспорт дихальних газів. Постійному та безперебійному виконанню цієї функції сприяє своєчасна заміна та оновлення старих еритроцитів. Час життя еритроцитів даних тварин приблизно однаковий і становить у бика 130–162; у коня 140 – 160; у собаки 97–133; у людини ~ 120 діб.

Еритроцити ссавців за внутрішньоклітинної концентрації катіонів можна розділити на дві групи: висококалієві та низькокалієві. Еритроцити людини, щура, кролика, свині відносяться до групи висококалієвих, оскільки вони містять 155, 135, 142, 140 ммоль/л K⁺ усередині клітини, відповідно. Тоді як собака, кіт, бик в еритроцитах містять натрій як переважний катіон у кількості 135, 104, 80 ммоль/л Na⁺ відповідно і відносяться до низькокалієвої групи. Мінеральний склад плазми крові всіх сільськогосподарських тварин подібний, найбільше іонів натрію та хлору. Для еритроцитів людини показано, що перевищення осмотичності середовища інкубації вище 1,3 Осмоль/кг призводить до порушення бар'єрних властивостей плазматичної мембрани еритроцитів, про що свідчить вихід внутрішньоклітинних катіонів калію.

4. Кріопшкодження еритроцитів

Для успішної розробки методів кріоконсервування еритроцитів для клінічних та дослідницьких цілей необхідно знати причини пошкоджень, що виникають при низькотемпературному впливі, а також механізми

захисту клітин кріопротекторами. В даний час для розуміння процесів, що відбуваються при заморожуванні еритроцитів, керуються двофакторною теорією П. Мазура. Відповідно до цієї теорії, *при повільному охолодженні* відбувається формування позаклітинних кристалів льоду, та вода виходить із еритроциту, що призводить до зменшення об'єму клітини. Ці фізичні процеси призводять до механічним ушкоджень, порушенню проникності мембрани, втрати іонів. *При швидкому заморожуванні* відбувається дегідратація клітин, збільшення концентрації розчинів усередині клітин. Внаслідок таких процесів виникає пошкоджуюча токсична дія розчинів (біохімічні пошкодження) та внутрішньоклітинне зростання кристалів льоду (механічне пошкодження).

При заморожуванні еритроцитів у фізіологічних умовах нижче за точку замерзання відбувається замерзання позаклітинної води, в результаті збільшується концентрація розчинів незамороженої фракції. Виникає різниця потенціалу поза- та внутрішньоклітинної мембрани, що призводить до виходу води з клітини. При подальшому охолодженні формується більше кристалів льоду позаклітинно, що призводить до значної дегідратації клітин. Якщо швидкість охолодження повільна, то рух води через мембрану буде підтримувати хімічну рівновагу. Таким чином, при повільній швидкості охолодження відбувається дегідратація еритроцитів, об'єм клітин зменшується і, отже, збільшується внутрішньоклітинна концентрація розчину. При такій швидкості охолодження пошкодження еритроцитів корелюють з виникненням ехіноцотозу (зморщування еритроцитів) та токсичною дією збільшення концентрації розчинів («ефект розчинів»). Пошкодження при повільному охолодженні залежать від зміни складу розчину та властивостей кріоконсервуючого середовища. Перші роботи були зроблені Джейсом Лавлоком у 1953 році, де було показано, що при критичних температурах концентрація поза- та внутрішньоклітинних солей досягається 0,8 моль/л під час заморожуванні, що призводить до незворотних змін еритроцитів після тривалого впливу заморожування та відтавання. Пізніше, у 1960 р. Меріман припустив, що еритроцити можуть підтримувати осмотичну рівновагу до мінімального об'єму клітин, досягнувши якого, відбуваються незворотні зміни в проникності мембрани, витік іонів і вихід їх у позаклітинне середовище. У сучасному уявленні про кріопшкоджуючу дію при повільному охолодженні крім «ефекту розчинів» існує ще і

фізична сила, що виникає при взаємодії з кристалами льоду, «упаковка еритроцитів» у незаморозжених каналах.

Проникність мембрани для води залежить від температури. Коли еритроцити охолоджують швидко, кристали льоду формуються позаклітинно і концентрація позаклітинних розчинів збільшується набагато швидше, ніж потік води із клітин. Коли цитоплазма клітини охолоджується нижче за точку замерзання, відбувається формування внутрішньоклітинних кристалів льоду. Цей механізм ще остаточно не вивчений. Внутрішньоклітинні кристали льоду забезпечують летальний кінець для еритроцитів і цього треба уникати. Дегідратації, збільшення концентрації розчинів та пошкодження мембрани при заморожуванні можна уникнути, використовуючи спеціальні умови охолодження.

Достатнє виживання еритроцитів може бути досягнуто використанням оптимальних швидкостей охолодження, що призведе до мінімального пошкодження від «ефекту розчинів» та формування внутрішньоклітинних кристалів льоду. Оптимальна швидкість охолодження залежить від розчину, що заморожується, і може бути модифікована при додаванні кріопротекторів. Заморожування еритроцитів при повільних швидкостях охолодження ($1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) призводить до 95% гемолізу. При збільшенні швидкості охолодження до $2300^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ значно знижується рівень пошкодження клітин.

Крім описаних вище кріопошкоджень, в даний час обговорюються безліч інших: суперохолодження цитоплазми, нуклеація льоду і зростання кристалів льоду, осмотичний стрес, рекристалізація під час розморожування. Успішне кріоконсервування еритроцитів є результатом численних досліджень у розумінні та захисті клітин від цих кріопошкоджень.

5. Кріопротектори

Кріопротектори, що використовуються для кріоконсервування еритроцитів, за їх дією та проникністю через мембрану класифікуються на дві групи: проникні та непроникні через мембрану всередину клітини.

Непроникні кріопротектори – сахариди, полімери та крохмалі (поліетиленгліколь – ПЕГ, гідроксиетильований крохмаль – ГЕК, полівінілпіролідон – ПВП). Ці речовини ефективні в мілімолярних концентраціях та забезпечують захисний ефект за допомогою дегідратації клітин перед заморожуванням, тим самим знижують формування

внутрішньоклітинних кристалів льоду, та при швидких швидкостях охолодження клітини замерзають ще до досягнення критичного рівня збільшення розчинів солей. Також вважається, що вони стабілізують мембрану та підтримують клітини в нативному стані.

Проникаючі кріопротектори – гліцерол та диметилсульфоксид (ДМСО) – проникають всередину клітини. Вони запобігають зменшенню об'єму клітин та збільшенню летальної концентрації електролітів, знижуючи температуру, за якої досягається критична концентрація солей, тобто проникаючі кріопротектори знижують точку замерзання розчину, що призводить до зниження кількості кристалів льоду.

В даний час гліцерол є класичним і найкращим кріопротектором для еритроцитів людини, оскільки він нетоксичний при високих концентраціях і швидко проникає у клітини при 37°C. Однак, перед застосуванням у клінічній практиці його, так само як і ДМСО, потрібно обов'язково видаляти з клітин для уникнення внутрішньосудинного гемолізу, що ускладнює процедуру підготовки деконсервованих клітин до трансфузії.

6. Методи кріоконсервування еритроцитів тварин

Методи кріоконсервування еритроцитів різняться по застосуванню кріопротекторів (проникаючі та непроникаючі), а також швидкостям охолодження клітин. Оптимальна швидкість охолодження залежить від типу заморожуваних клітин і використовуваного кріопротекторного розчину. Тому умовно ділять методи кріоконсервування на основі проникаючих та непроникаючих кріопротекторів, а також кріопротекторів змішаного типу.

Методи кріоконсервування еритроцитів тварин з проникаючими кріопротекторами

Перші роботи з кріоконсервування еритроцитів тварин було проведено у середині 20 століття. Вивчалися кріопротекторні властивості гліцеролу та диметилсульфоксиду (ДМСО) щодо еритроцитів бика. Показано, що гліцерол не здатний надати захисної дії при низькотемпературному впливі, що пов'язано з низьким проникненням його в клітини бика. ДМСО в концентрації 10 і 15% захищає клітини від ушкоджень при кріоконсервуванні. При цьому, еквілібрація в розчині кріопротектора до заморожування протягом 2 годин завдає більшого пошкодження, ніж протягом 30 секунд. Низька проникність гліцеролу в

еритроцити бика також підтверджена роботами в даний час. Показано, що низьке збереження клітин після заморожування під захистом гліцеролу корелює з низькою проникністю його у клітини. Швидкість дифузії гліцеролу через мембрану залежить від складу жирних кислот (плинності мембран) та наявності спеціального водного каналу – аквапорину 3 (AQ 3).

Зокрема, ступінь ненасичених жирних кислот має найбільше значення в еритроцитах коня і зменшується в ряду: кінь → собака → бик → людина, а індекс подвійних зв'язків має більше значення для еритроцитів людини. У зазначених еритроцитах знижено також молярне співвідношення холестерину до фосфоліпідів і фосфатидилхоліну до сфінгомієліну в порівнянні з іншими видами тварин. За представленими показниками можна судити про досить високу плинності мембрани, оскільки відомо, що чим більше ненасичених жирних кислот, вище співвідношення фосфатидилхоліну до сфінгомієліну і нижче вміст холестерину, тим значніше підвищується плинність мембрани, отже і швидкість дифузії гідрофільних молекул. Плинність ліпідного бішару вища в еритроцитах людини, тому і швидкість дифузії гліцерину через їхню мембрану більш висока. Деякі речовини проходять через клітинні мембрани зі швидкістю, що значно перевищує швидкість дифузії через ліпідний бішар. Забезпечення та регуляція їх перенесення здійснюється водними каналами (аквапоринами), які мають вибірковість до молекул, що проходять. Серед 13 відомих аквапоринів (AQP) ссавців було виділено AQP3, AQP7, AQP9 та AQP10 як сімейство аквагліцеропоринів, здатних до перенесення гліцеролу. AQP3 ідентифікований як важливий канал для транспортування гліцеролу в еритроцити людини та щурів. Еритроцити мишей не мають AQP3, але головним каналом для транспортування гліцеролу в цих клітинах є AQP 9. Для еритроцитів коня, бика та собаки подібних даних немає. Можливо, у них відсутні такі білкові канали або вони не є аквагліцеропоринами, що може обумовлювати низьку проникність їх мембран для молекул гліцерину.

Показано, що 20%-й гліцерин здатний забезпечити прийнятний рівень захисту еритроцитів коня при $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 років. Також показано збереження еритроцитів макак (87%) з 40% гліцеролом при заморожуванні до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. При використанні цього методу построзморозувальне виживання протягом 24 годин становить 85%, а тривалість життя деконсервованих еритроцитів – 13 днів.

Щодо еритроцитів собаки показано, що проникаючий кріопротектор гліцерол може бути ефективним при зберіганні клітин в рідкому азоті. При цьому використовується висока концентрація гліцеролу (40%) та заморожування здійснюють до -80°C . Оцінка морфо-функціональних показників таких еритроцитів свідчить про те, що основні функціональні параметри – рівень 2,3-ДФГ та АТФ – відразу після розморожування не відрізняються від контролю, а форма клітин за умови їх фіксації глутаровим альдегідом представлена переважно дискоцитами. Однак при використанні цього методу потрібна висока концентрація кріопротектора (40 %), що тягне за собою складнішу багатоступінчасту процедуру додавання кріопротектора перед заморожуванням та видалення кріопротектора з клітин перед проведенням трансфузії. Відомо, що гліцерол у концентрації 5–20 % не здатний забезпечити захист еритроцитів коня та собаки при швидкому заморожуванні до -196°C . Ця невідповідність може бути пов'язана із застосуванням складного багатоетапного процесу додавання кріопротектора в суспензію клітин перед заморожуванням. Застосування такого підходу резонно в експериментальних умовах, проте економічно та технічно малоефективно за умов кріобанку.

Високе збереження клітин (еритроцити собаки, коня, бика) при дії низькотемпературних факторів досягається з використанням ДМСО. Еритроцити, заморожені з 20% ДМСО до -196°C , виявляють 80% збереження клітин, високу стійкість у фізіологічних умовах за підтримки нормальної осмотичної крихкості. Однак, можливий прояв токсичної дії ДМСО. Тому потрібно з особливою обережністю ставитися до процедури видалення кріопротектора перед трансфузією

Методи кріоконсервування еритроцитів на основі непроникаючих кріопротекторів

Застосування проникаючих кріопротекторів створює певні технологічні проблеми під час використання у практиці кріобанків. Їх осмотична активність обумовлює необхідність видалення перед перенесенням в ізотонічні умови з метою запобігання лізису клітин. У зв'язку з цим активно розробляються безвідмивальні технології – вивчаються різні сполуки на їхню придатність як непроникні кріопротекторів. В силу малої токсичності непроникні кріопротектори в невеликих кількостях можуть бути внесені в кровеносне русло реципієнта

в процесі трансфузії деконсервованої крові. В якості таких кріопротекторів частіше використовують гідроксиетиленовий крохмаль (ГЕК) та поліетиленгліколь м.м. 1500 (ПЕГ–1500).

Гідроксіетильований крохмаль (ГЕК) м.м. 200 застосовують для захисту еритроцитів собак від низькотемпературних ушкоджень у концентрації 25–35 %. Заморожування здійснюють зануренням у рідкий азот (–196 °C). Досягається до 80% збережених клітин.

Для еритроцитів курей показано високе виживання клітин після кріоконсервування з ГЕК у концентрації 15–25%. Однак, незалежно від використовуваної концентрації, спостерігається високий рівень апоптозу та загибель клітин. Переливання таких деконсервованих клітин призведе до постртрансфузійного гемолізу еритроцитів у птахів.

При використанні поліетиленгліколя (ПЕГ м.м. 1500) як кріопротектора для еритроцитів коня, бика та собаки досягається високе збереження клітин після циклу заморожування-відтавання. Кріопротектор додають дозовано протягом 40 хвилин на холоді. Виживання клітин складає до 97%. Однак це вкрай недостатня оцінка для можливості застосування деконсервованих еритроцитів у ветеринарній практиці. При трансфузії відбувається перенесення клітин у кровеносне русло реципієнту. Отже, для успішного переливання клітини повинні бути стабільні у фізіологічних умовах, володіти достатніми механо-еластичними властивостями для проходження по капілярам. При оцінці цих параметрів показано значне порушення їх механо-еластичних властивостей, отже вони стають більш крихкими і менш еластичними.

7. Висновок

У ветеринарній медицині існує величезна необхідність у довгостроковому зберіганні еритроцитів тварин із збереженням цілісності та фізіологічної активності. Хоча технології кріоконсервування еритроцитів людини досить розвинені, щодо еритроцитів ссавців є лише поодинокі роботи. Недостатньо дослідженим залишається поведінка еритроцитів різних видів ссавців за умов дії низьких температур та кріопротекторів. Від правильного вибору кріопротектора, його концентрації, додавання до клітинної суспензії, тривалості експонування на етапі насичення кріопротектором залежить успіх кріоконсервування. Актуальним є вивчення кріопротекторів різних механізмів дії та їх концентрації на морфо-функціональні показники, а також тестування

деконсервованих клітин на функціональну активність після заморожування-обігріву та розробка на цій основі адекватних методів довгострокового зберігання донорської крові домашніх тварин.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Функції еритроцитів.
2. Особливості будови еритроцитів тварин.
3. Будова та функції клітинних мембран.
4. Універсальність будови клітинної мембрани та еритроцитів різних видів ссавців.
5. Термін «видоспецифічність».
6. Видоспецифічність клітинної мембрани та еритроцитів різних видів ссавців.
7. Особливості метаболізму еритроцитів ссавців.
8. Особливості гіпотермічного зберігання продуктів крові тварин.
9. Кріопротектори та кріоконсерванти.
10. Проникаючі та непроникаючі кріопротектори.
11. Гліцерин як кріопротектор.
12. Ефективність гліцерину за умов кріоконсервування еритроцитів людини і тварин.
13. Поняття про швидкості охолодження та відігріву біологічних об'єктів.
14. Концепції, теорії та фактори кріпошкоджень біоб'єктів.
15. Кріпошкодження клітин при повільному та швидкісному заморожуванні.
16. Роль води в процесах кріпошкодження.
17. Механізми та динаміка процесів кристалоутворення.
18. Створення кріобанків.
19. Особливості кріоконсервування клітин крові.
20. Умови довгострокового зберігання еритроцитів.
21. Методи оцінювання структурно-функціональних характеристик клітин після кріоконсервування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Основы криобиологии и криомедицины: учебник для студентов – биологов и медиков / Г.Ф. Жегунов, О.А. Нардид, Б.Т. Стегний и др.; под. ред. проф. Г.Ф. Жегунова и О.А. Нардид. – Х.: ФЛП Бровин А.В., 2019. – 616с.
2. Белоус А.М. Криобиология / А.М. Белоус, В.И. Грищенко. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
3. Актуальные проблемы криобиологии. – Киев: Наукова думка, 1981. – С. 157 – 188.
4. Белоус А.М. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. / А.М. Белоус, В.А. Бондаренко. – Киев: Наук. думка, 1982. – 255 с.
5. Пушкарь Н.С. Введение в криобиологию / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус. – Киев: Наукова думка, 1975. – 343 с. Методичне забезпечення 7. Жегунов Г.Ф., Денисова О.М. Історія, задачі криобіології. Кріопшкодження клітин при заморожуванні. – Х.: РВВ. ДБТУ, 2021. – 28 с.
6. Жегунов Г.Ф., Денисова О.М. Кріопротектори та кріоконсерванти. – Х.: РВВ. ДБТУ, 2021. – 20 с.
7. Жегунов Г.Ф., Денисова О.М. Кріопшкодження клітин. - Х.: РВВ. ДБТУ, 2022.-30 с.
8. Денисова О.Н. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, глицерина / О.Н. Денисова, Г.Ф. Жегунов, Л.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. — 2005. — № 2. — С.195-201.
9. Exploring the Possibility of Cryopreservation of Feline and Canine Erythrocytes by Rapid Freezing with Penetrating and Non-Penetrating Cryoprotectants / [D. Pogozhykh, Y. Pakhomova, O. Pervushina та ін.] // PLoS One. — 2017. — С.1-2. — Режим доступа: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169689>
10. Scott K.L. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future / K.L. Scott, J. Lecak, J. Acker // Transfusion Medicine Reviews. — 2005. — Vol. 19, № 2. — С.127-142. — Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796304000811?via%3Dihub>

11. Kaneko J. Clinical biochemistry of domestic animals / J. Kaneko, J. Harvey, M. Bruss. – New York: Academic Press, 1997. – 932 с.
12. Жегунов Г.Ф. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень сохранности после замораживания-оттаивания / Г.Ф. Жегунов, О. Н. Денисова // Доповіді національної академії наук України, 2010. – № 12. – С. 139-143.
13. A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation / [H. Kim, S. Tanaka, S. Une та ін.] // J. Vet. Med. Sci. . – 2004. – № 66. – С.1543-1547. – Режим доступа:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/66/12/66_12_1543/article
14. Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cells. / J. Graham , D.M. Meola , N.R. Kini, N.M. Hoffman // Am J Vet Res.. – 2015. – № 76 (6). – С.487-493. – Режим доступа:
https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.76.6.487?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed

Денисова О.М.
Тихвинська О.О.
Шпакова Н.М.
Бабійчук Л.О.
Божкова Ю.О.

МЕТОДИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ТВАРИН

Методичні рекомендації для самостійної роботи

аспірантів 2 курсу

галузь знань 09 Біологія

спеціальність 091 Біологія

Дисципліна «Кріоветеринарія»

Електронний ресурс. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
2022.