

Изучение криозащитного действия холинхлорида при замораживании лейкоцитов до -40°C

О.О. ЗАЙЦЕВА¹, Е.П. СВЕДЕНЦОВ¹, О.Н. СОЛОМИНА¹, Т.В. ТУМАНОВА¹,

Г.А. НИКУЛИНА¹, С.В. УТЕМОВ², А.А. КОСТЯЕВ², Ф.С. ШЕРСТНЕВ²

¹Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

²Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Study of Choline Chloride Cryoprotective Effect Under Leukocyte Freezing Down to -40°C

O.O. ZAJTSEVA¹, E.P. SVEDENTSOV¹, O.N. SOLOMINA¹, T.V. TUMANOVA¹,

G.A. NIKULINA¹, S.V. UTEMOV², A.A. KOSTYAEV², F.S. SHERSTNEV²

¹Institute of Physiology of Komi Scientific Center of Ural Division of Russian Academy of Sciences, Syktывkar, Russia

²Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

В современной криобиологии актуальным остается поиск новых веществ, обладающих криозащитными свойствами. При замораживании эритроцитов крови человека до -196°C по быстрой и медленной линейной программам Гулевским А.К. и соавт. (1987 г.) проведено исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов холинхлорида и его криозащитных свойств. Авторы предложили применять данное вещество как дополнительный ингредиент в составе криозащитных сред для повышения их эффективности.

Цель работы – изучение криозащитных свойств холинхлорида при замораживании ядерных клеток крови до умеренно низкой температуры (-40°C) по экспоненциальному режиму.

Объектом исследования служил концентрат лейкоцитов, выделенный из цельной донорской крови путем цитофереза. Среднее количество биообъекта составляло $18,2 \pm 5,3$ мл. Клетки смешивали в соотношении 1:1 с криозащитным раствором в пластиковом контейнере “Компопласт 300” и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин. Использовали 2 криозащитных раствора: 1-й включал только эндоцеллюлярный криопротектор 1,2-пропандиол (ПД) в конечной концентрации 21%; 2-й – дополнительно холинхлорид в конечной концентрации 1%. Замораживание клеток производили по медленной трехэтапной программе сначала в спиртовой (96°) ванне камеры электроморозильника “Криостат”, охлажденной до -28°C в течение 15 мин, затем в морозильнике на -40°C . Быстрое размораживание биообъекта осуществляли через сутки в 20-литровой водяной ванне, нагретой до 38°C в течение 45–60 с (в зависимости от объема биообъекта) при интенсивном покачивании контейнера.

Результаты исследований показали, что при замораживании лейкоцитов с раствором 1 количество лейкоцитов после их отогрева составило $67,2 \pm 16,1\%$ от исходного уровня, а с раствором 2 – достоверно ($p < 0,05$) больше ($89,6 \pm 9,2\%$). При анализе лейкоформулы в опытах с раствором 1 количество гранулоцитов также было достоверно ниже, чем в опытах с раствором 2, и составило $39,2 \pm 9,8$ и $77,9 \pm 11,2\%$ соответственно. Оценить фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) стало возможно только в опытах с раствором, содержащим холинхлорид. Она наблюдалась у $66,4 \pm 5,2\%$ отогретых нейтрофилов. В опытах, содержащих только ПД, определить ФАН не удалось в связи с быстрым разрушением клеток после размораживания. Таким образом, применение холинхлорида совместно с основным криопротектором существенно повышает эффективность замораживания лейкоцитов до -40°C по экспоненциальному режиму.

The search for new substances with cryoprotective properties has remained to be actual in current cryobiology. When freezing human erythrocytes down to -196°C with rapid and slow linear programs [Gulevsky A.K. et al., 1987] there were studied the phase transitions and physical states of choline chloride aqueous solutions and its cryoprotective properties. The authors have proposed to apply this substance as an additional ingredient as a part of cryoprotective media to increase their efficiency. This research was aimed to study the choline chloride cryoprotective properties when freezing blood nucleated cells down to a moderately low temperature (-40°C) by an exponential regimen.

Leukocyte concentrate, isolated from the whole donor blood by cytopheresis, served as the research object. An average number of bioobject was 18.2 ± 5.3 ml. Cells were mixed with cryoprotective solutions in 1:1 ratio in “Komplast 300” plastic container and exposed at room temperature for 20 min. We have used 2 cryoprotective solutions: the 1st one comprised only 1,2-propanediol (PD) endocellular cryoprotectant in 21% final concentration; the 2nd one did an additional choline chloride in 1% final concentration. Cells were frozen by a slow three-step program primarily in alcohol (96°) bath of “Kriostat” electric freezer chamber, cooled down to -28°C for 15 min, then in a freezer at -40°C . Rapid thawing of bioobject was realized one day later in 20 l water bath, heated up to 38°C for 45–60 sec (depending on bioobject’s volume) under intensive container shaking.

Research results have demonstrated that under freezing of leukocytes with the 1st solution, their number after thawing was $67.2 \pm 16.1\%$ of an initial level, and with the 2nd one it was statistically and significantly ($p < 0.05$) higher ($89.6 \pm 9.2\%$). When analysing leukoformula in trials with the 1st solution the granulocyte number was also statistically and significantly lower, than in those with the 2nd solution and made 39.2 ± 9.8 and $77.9 \pm 11.2\%$, correspondingly. The estimation of neutrophil phagocyte activity (NPA) occurred to be possible only in trials with choline chloride-containing solution. NPA was observed in $66.4 \pm 5.2\%$ of thawed neutrophils. In the trials, containing only PD, the NPA determination failed due to a rapid cell destruction after freeze-thawing. Thus, the choline chloride application together with the main cryoprotectant significantly increases the efficiency of leukocyte freezing down to -40°C by exponential regimen.