

УДК 611–018.51: 615.361.018.46–014.41

Криоконсервирование эритроцитов при температурах -40°C и -80°C

Канд. мед. наук Г. Ю. КИРЬЯНОВА¹, д-р мед. наук С. Д. ВОЛКОВА²,
канд. мед. наук А. Д. КАСЬЯНОВ³, канд. биол. наук Г. В. ГРИШИНА⁴,
И. С. ГОЛОВАНОВА⁵, д-р мед. наук А. В. ЧЕЧЕТКИН⁶

¹kirianova@mail.ru, ²volk.serafima@yandex.ru, ³Kaslab52@mail.ru, ⁴reger201309@mail.ru,
⁵irina_golovanova2014@list.ru, ⁶bloodscience@mail.ru
Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА
191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

В статье представлены результаты криоконсервирования эритроцитов при температурах -40°C и -80°C . Отмечена значительно более высокая сохранность и функциональная полноценность эритроцитов, декриоконсервированных после хранения в течение 2–5-ти месяцев в объеме стандартной дозы при температуре -40°C , в отличие от -80°C . По уровню гемолиза, содержанию гемоглобина в дозе, количеству осмотически неустойчивых эритроцитов разница между низкотемпературным хранением при -40°C и -80°C была статистически значима. Так, процент гемолиза во взвесах отмытых размороженных эритроцитов, криоконсервированных при -40°C и при -80°C , составил $0,06\pm 0,011$ и $0,53\pm 0,125$ соответственно. В отмытых размороженных эритроцитах, хранившихся при -80°C , отмечено низкое содержание в дозе гемоглобина ($18,4\pm 1,69$ г) и процента сохраненных клеток ($31,1\pm 3,09$). Не выявлено существенной зависимости данных показателей от способа размораживания (в водяной бане при 40°C или в аппарате SAHARA), а также метода замораживания до -80°C (линейного или двухступенчатого). В то же время содержание гемоглобина в дозе деглицеринизированных эритроцитов, хранившихся при температуре -40°C , составило $49,5\pm 1,88$ г, сохранность эритроцитов — $83,8\pm 4,09\%$, что соответствует современным критериям пригодности данной среды.

Ключевые слова: криоконсервирование, отмытые размороженные эритроциты, деглицеринизация, умеренно низкие температуры.

Информация о статье

Поступила в редакцию 27.05.2016, принята к печати 09.02.2017

doi: 10.21047/1606-4313-2017-16-1-72-78

Ссылка для цитирования

Кирьянова Г. Ю., Волкова С. Д., Касьянов А. Д., Гришина Г. В., Голованова И. С., Чечеткин А. В. Криоконсервирование эритроцитов при температурах -40°C и -80°C // Вестник Международной академии холода. 2017. № 1. С. 72-78.

Cryopreservation of erythrocytes at -40°C and -80°C

Ph. D. in medicine G. YU. KIRYANOVA, Dr. Med. Sc. S. D. VOLKOVA,

Ph. D. in medicine A. D. KASYANOV, Ph.D in Biol. Sc. G. V. GRISHINA, I. S. GOLOVANOVA,

Dr. Med. Sc. A. V. CHECHETKIN

Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology of Federal medico-biological Agency, Russia, St. Petersburg

Results of cryopreservation of erythrocytes at the temperatures of -40°C and -80°C are presented in the article. Standard dose of erythrocytes decryopreserved after storage within 2–5 months at -40°C was shown to be much safer and more functionally full unlike its behavior at -80°C . The difference between low-temperature storage at -40°C and -80°C was statistically significant in terms of hemolysis level, hemoglobin content in the dose and the quantity of osmotically unstable erythrocytes. The hemolysis rate in suspensions of washed defrozen erythrocytes cryopreserved at -40°C and at -80°C was 0.06 ± 0.011 and 0.53 ± 0.125 respectively. The washed defrozen erythrocytes stored at -80°C were shown to exhibit low hemoglobin content (18.4 ± 1.69 g) and percentage of preserved cells (31.1 ± 3.09) in the dose. A meaningful dependence of these indicators on a method of defreezing (in water bath at 40°C or in the SAHARA device), and also on a method of freezing to -80°C (linear or two-level) was not found. At the same time the content of hemoglobin in a dose of the deglycerinized erythrocytes stored at -40°C was 49.5 ± 1.88 g, safety of erythrocytes — $83.8\pm 4.09\%$ that meets modern criteria of this medium applicability.

Keywords: cryopreservation, washed defrozen erythrocytes, deglycerinization, moderate low temperatures, morphophysiology properties.

Введение

Криоконсервирование эритроцитов является единственным способом их долгосрочного хранения, позволяющим создавать запасы красных клеток крови (в том числе фенотипированных, аутологичных, редких групп), а также решать проблемы рационального использования эритроцитных средств. Длительный срок хранения замороженных эритроцитов обеспечивает возможность проведения их карантинизации с целью профилактики гемотрансмиссивных инфекций, создания запасов серонегативных по ЦМВ эритроцитов для особых групп реципиентов, накопления нескольких доз от одного донора для осуществления принципа «один донор — один реципиент» [1; 2]. Важно отметить, что криоконсервированные эритроциты являются стратегическим запасом на случай возникновения чрезвычайных ситуаций природного или техногенного характера. Кроме того, отмытая размороженная эритроцитная взвесь является ареактогенной средой, так как в процессе криоконсервирования разрушается большая часть лейкоцитов и тромбоцитов, а при отмывании удаляются белки плазмы, антитела, строма разрушенных клеток, продукты их метаболизма, цитокины и микроагрегаты, накопившиеся в эритромассе до ее замораживания [3, 4].

Исторически сложилось так, что наиболее раннему и детальному изучению были подвергнуты именно эритроциты как безъядерные, и тем самым, более устойчивые к замораживанию клетки крови. На модели эритроцитов отрабатывались температурные режимы замораживания и избирались наиболее эффективные криозащитные и консервирующие растворы [5]. Детально изучены как низкомолекулярные соединения (диметилсульфоксид, диметилацетамид, 1,2-пропандиол и др.), проникающие внутрь клетки (интрацеллюлярные), так и высокомолекулярные непроникающие (экстрацеллюлярные) соединения (поливинилпирролидон, полиэтиленоксид, гидроксизтилкрахмал, дисахариды, многоатомные спирты и т. д.). В конечном итоге наибольшую популярность среди криопротекторов приобрел глицерин [6].

В механизме защитного действия глицерина (помимо связывания и замещения молекул воды) большое значение имеет его способность поддерживать уровень фосфорилирования скелетных белков эритроцитов, что важно в сохранении целостности структуры, формы и деформируемости клетки. Помимо того показана способность глицерина связывать свободные радикалы, образующиеся в процессе перекисного окисления при замораживании — оттаивании, и тем самым предотвращать их токсическое действие.

Несмотря на трудоемкость процесса отмывания замороженных эритроцитов от интрацеллюлярных криопротекторов, в настоящее время наиболее распространены методы криоконсервирования эритроцитов:

— метод быстрого замораживания с 15–20% глицерином при ультранизкой температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в жидком азоте;

— метод медленного замораживания с 20–40% глицерином при умеренно низких (-5 , -30 , $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) и низких ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) температурах в электрохолодильниках.

Основанием для их практического применения служит действующая «Инструкция по криоконсервированию клеток крови», утвержденная МЗ РФ 29.05.1995 г [7; 8].

Преимущество использования ультранизких температур заключается в возможности длительного (до 10 лет и более) хранения эритроцитов в замороженном состоянии, а основным недостатком является необходимость специального оборудованного криобанка и емкостей с жидким азотом. Более дешевыми и доступными для практического применения признаны методы медленного нерегулируемого замораживания в низкотемпературных электрохолодильниках, что, однако, в разной степени (в зависимости от температуры) сокращает возможные сроки хранения криоконсервированных эритроцитов.

К общим недостаткам методов криоконсервирования с глицерином следует отнести продолжительность процедур деглицеринизации, предусматривающих повторные циклы отмывания (от 2-х до 5-ти) путем центрифугирования, значительную занятость медперсонала, большие потери эритроцитов (до 30% от исходного объема), а также короткие сроки хранения размороженных и отмытых эритроцитов при использовании «открытого» способа глицеринизации и деглицеринизации.

В связи с усилением контроля качества заготовленных гемоконпонентов и вступлением в силу Федерального закона № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», часть станций и отделений переливания крови (СПК и ОПК) перешла на автоматическую глицеринизацию и деглицеринизацию после размораживания эритроцитов с помощью аппарата Haemonetics ACP 215, широко представленную в зарубежной литературе [9–12]. В то же время высокая стоимость аппаратуры и расходных материалов ограничивает широкое внедрение метода в повседневную практику. Кроме того, отсутствие утвержденной в России инструкции по использованию аппаратного метода не позволяет удлинять срок хранения деглицеринизированных эритроцитов. В результате вышеуказанных причин объем выдачи декриоконсервированных эритроцитов учреждениями службы крови в медицинские организации в период с 2009 по 2013 гг. снизился на 38,6%.

Последние отечественные разработки по созданию новых образцов полимерных систем с криопротектором на основе глицерина открывают возможность более широкого внедрения отечественного оборудования для замораживания эритроцитов в повседневную практику учреждений Службы крови России [13].

Целью работы явилось исследование сохранности и морфофункциональных свойств эритроцитов криоконсервированных при температурах $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с использованием различных режимов замораживания и размораживания.

Материалы и методы

Материалом исследования служили дозы эритроцитной массы (ЭМ), полученные из донорской крови (2–4-х суток хранения), подлежащие криоконсервированию, а также взвеси отмытых размороженных эритроцитов (ОРЭ) в ресуспендирующем растворе.

В работе использовались: комплект изделий для криоконсервирования эритроцитов однократного применения, стерильный «Синтез», ТУ 9398-113-00480201-2010 № ФСР 2012/13086; комплект изделий для отмывания и ресуспендирования криоконсервированных эритроцитов однократного применения, стерильный «Синтез», ТУ 9398-114-00480201-2011 № ФСР 2012/13244 от 20.03.2012; центрифуги Sorvall RS 3BP; CRYOFUGp 5500, рефрижераторы на -40 и -80 °С, аппарат для размораживания и подогрева крови и компонентов SAHARA III TRANSMED.

В качестве криоконсервирующего раствора использовали «Криосин» (глицерол — 400 мл; маннит — 40 г, натрия хлорид — 7 г, натрия фосфат двузамещенный — 0,3 г, вода для инъекций до 1000 мл). Для отмывания размороженных эритроцитов последовательно в трех циклах центрифугирования применялись растворы «Маннисин 1» (маннит — 160 г, натрия хлорид — 7 г, вода для инъекций до 1000 мл); «Маннисин 2» (маннит — 50 г, натрия хлорид — 7 г, вода для инъекций до 1000 мл); «Маннисин 3» (маннит — 25 г, натрия хлорид — 7 г, вода для инъекций до 1000 мл).

Трижды отмые размороженные эритроциты помещали в ресуспендирующий раствор «Ресин» (сахароза — 70 г; хлорид натрия — 3 г, гидрофосфат натрия — 2 г, дигидрофосфат натрия — 1 г, вода для инъекций до 1000 мл).

Практическая возможность применения изделий ОАО «Синтез» для криоконсервирования, деглицеринизации и ресуспендирования размороженных эритроцитов была изучена в трех сериях опытов, при двух температурах замораживания (-40 °С и -80 °С) — крайних из диапазона температур, указанных в инструкции по применению изделий.

В I серии исследовано 10 образцов исходной эритроцитной массы и 20 образцов взвесей отмываемых размороженных эритроцитов, помещенных в ресуспендирующий раствор «Ресин», и проведена сравнительная оценка влияния на качество эритроцитов температур -40 и -80 °С.

Во II серии опытов замораживание эритроцитов осуществлялось линейным (непосредственно до -80 °С) и двухступенчатым (первоначально до -40 °С и через сутки до -80 °С) способами. Исследовано также 10 образцов исходной эритроцитной массы и 20 образцов взвесей ОРЭ.

В III серии экспериментов криоконсервированию при -40 °С ($n = 5$) и при -80 °С ($n = 5$) подвергались целые (стандартные) дозы ЭМ.

В I и II сериях для замораживания использовалась ЭМ, полученная из крови, консервированной на «Глюцире», в III серии — на CPDA-1; без снятия ЛТС.

Всего исследовано 30 образцов ЭМ и 50 образцов взвесей отмываемых размороженных эритроцитов.

Морфофункциональное состояние эритроцитов оценивали с помощью комплекса лабораторных методик, включающих морфологическую оценку в световом микроскопе (морфологический индекс); определение общего и свободного гемоглобина, гематокрита, осмотической резистентности эритроцитов и процента гемолизированных клеток, ряда биохимических и гематологических показателей на газоанализаторе «ABL — 800 FLEX» (в том числе pH, K^+ , $p50$ и др.) и на анализаторе Medonic M соответственно. Для определения АТФ использовали

биолюминесцентный набор (Adenosine 5-triphosphate Bioluminescent Assay Kit, SIGMA-ALDRICH) и биохемилюминометр БХЛ-06М (Россия).

Процент сохранных эритроцитов после процедур замораживания, размораживания и отмывания рассчитывали по содержанию гемоглобина (Hb). При этом содержание гемоглобина в дозе ЭМ или ОРЭ определяли с учетом общего Hb (г/л), веса компонента и коэффициента перевода весового параметра в объемный, меняющегося в зависимости от гематокрита.

В таблицах приведены: n — число наблюдений, M — среднее арифметическое, SE — стандартная ошибка среднего. Для сравнения средних значений двух совокупностей применяли t критерий Стьюдента. О статистической достоверности различий свидетельствовал показатель $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

В I серии собственных исследований дозы эритроцитной массы (ЭМ), после взятия исходных проб и соединения с криопротектором «Криосин», делились на 2 равные части и каждая из частей замораживалась соответственно при температуре -40 °С и -80 °С на срок 1,5–2 мес.

Отдельные физико-химические, биохимические и гематологические показатели взвесей размороженных и отмываемых эритроцитов представлены в табл. 1 и 2.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о лучшей сохранности эритроцитов (1/2 дозы), хранившихся при температуре -40 °С в течение 1,5–2-х мес. (по содержанию общего гемоглобина, морфологическому индексу, $p50$, содержанию АТФ и внеклеточного калия и др.).

По таким показателям, как содержание свободного гемоглобина, количество осмотически неустойчивых эритроцитов, процент гемолиза и процент выхода эритроцитов разница между низкотемпературным хранением при -40 °С и -80 °С статистически значима. Так, содержание осмотически неустойчивых клеток (ОНЭ) во взвесах отмываемых размороженных эритроцитов, криоконсервированных при -40 °С, составило $1,0 \pm 0,24\%$ против $5,6 \pm 1,26\%$ в ОРЭ, хранившихся при -80 °С; процент гемолиза равнялся $0,06 \pm 0,009$ и $0,28 \pm 0,064$ соответственно. Процент сохранных клеток после процедур замораживания-оттаивания-отмывания также был значительно выше после хранения при -40 °С ($86,5 \pm 3,46\%$ против $67,9 \pm 5,53\%$).

Следует отметить тенденцию к более высокому содержанию гемоглобина в одном эритроците (MCH) и его средней концентрации (MCHC) — $349,4 \pm 4,27$ против $315,6 \pm 5,43$ г/л — в эритроцитах, декриоконсервированных после хранения при -40 °С, а также более приближенные к норме объем этих клеток ($86,1 \pm 1,26$ против $91,9 \pm 2,32$ $\mu\text{м}^3$) и морфологический индекс (табл. 2).

Учитывая полученные данные о положительном влиянии медленного замораживания эритроцитов до -40 °С (и последующего их хранения при данной температуре) на сохранность морфофункциональных свойств красных клеток представилось целесообразным для улучшения результатов криоконсервирования при -80 °С

Таблица 1

Характеристика взвесей отмытых размороженных эритроцитов, хранившихся при температуре –40 и –80 °С в течение 1,5–2-х месяцев, и исходной ЭМ (M±SE)

Показатели	Взвеси ОРЭ, криоконсервированных при –40 °С (n = 10)	Взвеси ОРЭ, криоконсервированных при –80 °С (n = 10)	Исходная ЭМ до соединения с криопротектором (n = 10)
Объем, мл	150,0±12,69	132,7±9,46	192,5±11,6
Гематокрит, л/л	0,37±0,021	0,38±0,133	0,88±0,212
Общий гемоглобин, г/л	128,4±6,25	121,4±4,66	229,1±7,21
Свободный гемоглобин, г/л	0,12±0,012*	0,53±0,109	0,90±0,271
Процент гемолиза	0,06±0,009*	0,28±0,064	0,07±0,019
ОНЭ, %	1,0±0,24*	5,6±1,26	9,7±2,07
Содержание АТФ мкМ/г Нб	4,87±0,22	4,74±0,20	4,91±0,19
p50, mm Hg	40,8±1,12	42,7±1,82	41,6±0,92
Содержание К ⁺ , моль/л	0,7±0,04	0,9±0,06	16,0±1,65
pH	6,47±0,017	6,47±0,014	6,67±0,005
Содержание остаточных лейкоцитов, ×10 ⁹ /л	0,43±0,055	0,45±0,051	—
Процент сохраненных эритроцитов	86,5±3,46*	67,9±5,53	100

Примечание: знаком * обозначено статистически достоверное различие (p < 0,05) по сравнению с ОРЭ, криоконсервированными при –80 °С.

Таблица 2

Гематологические показатели качества отмытых размороженных эритроцитов, хранившихся при температуре –40 и –80 °С в течение 1,5–2-х месяцев, и исходной ЭМ (M±SE)

Показатели	Взвеси ОРЭ, криоконсервированных при –40 °С (n = 10)	Взвеси ОРЭ, криоконсервированных при –80 °С (n = 10)	Исходная ЭМ до соединения с криопротектором (n = 10)
Эритроциты, ×10 ¹² /л	4,31±0,206	4,16±0,207	7,50±0,193
Морфологический индекс	97,4±0,41	96,2±0,66	99,7±0,12
MCV, мкм ³	86,1±1,26	91,9±2,32	98,4±1,88
MCH, пг	30,1±0,68	29,0±0,55	29,8±0,67
MCHC, г/л	349,4±4,27	315,6±5,43	302,7±2,4

испытать способ двухступенчатого замораживания до данной температуры.

Была поставлена II серия опытов, в которой одна из разделенных на 2 равные части ЭМ замораживалась при температуре –80 °С, другая — первоначально при –40 °С, с последующим переносом (через сутки) в электрохолодильник на –80 °С на срок 2–6 мес. Исследовано 10 доз образцов исходной эритроцитарной массы (до соединения с криоконсервантом) и 20 образцов отмытых размороженных эритроцитарных взвесей (по ½ дозы).

Результаты исследований показали, что двухступенчатый режим замораживания до –80 °С не оказывает положительного влияния на основные параметры взвесей отмытых размороженных эритроцитов (повышенный по сравнению с –40 °С уровень гемолиза и содержания осмотически неустойчивых эритроцитов, сниженный процент сохранности клеток). Все отмеченные различия в показателях морфофункциональной полноценности эритроцитов между двумя режимами замораживания до –80 °С не являются статистически значимыми, поэтому в статье не приводятся.

Для постановки III серии экспериментов было заморожено по 5 стандартных доз ЭМ при –40 °С и при –80 °С (в целях получения более полных результатов по всем изучаемым параметрам, а также данных о содержании гемоглобина в дозе). Размораживание и деглицеринизация проводились после 2–5-ти мес. хранения при данных температурах.

Результаты исследований представлены в табл. 3 и 4.

При анализе результатов III серии экспериментов подтверждена значительно лучшая сохранность красных клеток, криоконсервированных при температуре –40 °С в течение 2–5-ти мес., при этом разница между низкотемпературным хранением при –40 °С и –80 °С была более значима, чем при замораживании половинных доз. Так, содержание осмотически неустойчивых клеток во взвесах отмытых размороженных эритроцитов, криоконсервированных при –40 °С, составило 4,1,0±1,84% против 23,6±7,11% в ОРЭ, хранившихся при –80 °С; процент гемолиза равнялся 0,06±0,011 и 0,53±0,125 (p < 0,01) соответственно (табл. 3). В то же время повышенное содержание в дозе ОРЭ остаточных

Таблица 3

Характеристика взвесей целых доз отмытых размороженных эритроцитов, хранившихся при температуре –40 и –80 °С в течение 2–5 месяцев, и исходной ЭМ (M±SE)

Показатели	Криоконсервирование при –40 °С (n = 5)		Криоконсервирование при –80 °С (n = 5)	
	Исходная ЭМ	Взвесь ОРЭ	Исходная ЭМ	Взвесь ОРЭ
Объем, мл	242,4±8,44	328,4±15,89*	241,6±10,49	149,1±11,25
Гематокрит, л/л	75,4±2,00	43,2±0,69	75,5±1,78	41,7±1,39
Общий гемоглобин, г/л	249,4±5,95	151,2±2,26	246,9±3,44	121,7±5,79
Содержание гемоглобина в дозе	60,5±2,69	49,5±1,88*	59,5±2,02	18,4±1,69
Свободный гемоглобин, г/л	—	0,16±0,029*	—	1,10±0,28
Процент гемолиза	—	0,06±0,011*	—	0,53±0,125
ОНЭ, %	—	4,1±1,84**	—	23,6±7,11
p50, mm Hg	38,3±0,81	42,3±3,55	39,9±0,64	41,7 (n=1)
Содержание K ⁺ , моль/л	11,9±1,06	0,8±0,04	13,3±0,14	1,0±0,03
Содержание остаточных лейкоцитов, ×10 ⁹ /л	—	0,77±0,082	—	1,1±0,17
Процент сохраненных эритроцитов	100	83,8±4,09*	100	31,1±3,09

Примечание: знаком (**) обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,05$); знаком (*) обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,01$) по сравнению с ОРЭ, криоконсервированными при –80 °С

Таблица 4

Гематологические показатели качества целых доз отмытых размороженных эритроцитов, хранившихся при температуре –40 °С и –80 °С в течение 2–5-ти месяцев, и исходной ЭМ (M±SE)

Показатели	Криоконсервирование при –40 °С (n = 5)		Криоконсервирование при –80 °С (n = 5)	
	Исходная ЭМ	Взвесь ОРЭ	Исходная ЭМ	Взвесь ОРЭ
Эритроциты, ×10 ¹² /л	8,1±0,34	5,1±0,09	8,2±0,18	4,3±0,14
Морфологический индекс	94,4±0,87	96,4±1,63	96,4±0,28	94,2±1,99
MCV, мкм ³	84,7±2,29	85,9±2,06	84,5±1,18	98,6±4,65
MCH, пг	30,1±0,90	29,9±0,84	29,1±0,66	28,3±0,79
MCHC, г/л	356±4,1	348±3,5	344±4,3	290±15,5

лейкоцитов ($0,25 \times 10^9$) при норме не более $0,1 \times 10^9$ диктует необходимость предварительной лейкоредукции эритроцитарной массы для повышения иммунологической и инфекционной безопасности отмытых размороженных эритроцитов [2].

Отмечено низкое содержание в дозе гемоглобина ($18,4 \pm 1,69$ г) и процента сохраненных клеток ($31,1 \pm 3,09$) в ОРЭ, хранившихся при –80 °С. Не выявлено существенной зависимости данных показателей от способа размораживания (в водяной бане при 40 °С или в аппарате SAHARA). При размораживании в SAHARA процент сохраненных клеток составил $29,7 \pm 1,94$; этот же параметр при размораживании в водяной бане соответствовал $32,1 \pm 3,60$ %.

В то же время содержание гемоглобина в дозе деглицеринизированных эритроцитов, хранившихся при умеренно низкой температуре –40 °С, составило $49,5 \pm 1,88$ г, сохранность эритроцитов — $83,8 \pm 4,09$ %,

что в 2,7 раза выше, чем при –80 °С и соответствует современным критериям пригодности данной среды.

Следует отметить, что разработанный в 90-е годы XX века метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах (–25 °С, -38 ± 2 °С) со сниженной концентрацией глицерина показал, что при использовании в качестве оградяющего раствора ЦНИИГПК-11₅М (аналога раствора «Криосин») снижение температуры замораживания всего на 5 °С (до –45 °С) также приводило к существенному увеличению процента разрушенных эритроцитов после оттаивания (с 1,0% до 14,3%) [8].

При оценке гематологических показателей (табл. 4) обращает на себя внимание более высокая средняя концентрация гемоглобина в одном эритроците (MCHC) — $348 \pm 3,5$ (против $290 \pm 15,5$ г/л) — в эритроцитах, декриоконсервированных после хранения при –40 °С, а также более приближенный к норме объем этих клеток ($85,9 \pm 2,06$ против $98,6 \pm 4,65$ мкм³).

Заклучение

Результаты проведенных экспериментов показали более высокую сохранность эритроцитов, криоконсервированных при температуре -40°C , как в объеме половинной, так и в объеме стандартной дозы. При этом по основным показателям качества отмытых размороженных эритроцитов, разница между низкотемпературным хранением при -40°C и -80°C была статистически более значима при замораживании полных доз, в отличие от половинных, когда на результаты криоконсервирования положительное влияние может оказывать увеличение скорости замораживания более тонкого слоя эритроцетов.

Не выявлено существенной зависимости изученных показателей от способа размораживания (в водяной бане при 40°C или в аппарате SAHARA), а также метода замораживания до -80°C (линейного или двухступенчатого).

В хранившихся при -80°C стандартных дозах ОРЭ низкое содержание гемоглобина ($18,4 \pm 1,69$ г/доза) и процента сохраненных клеток ($31,1 \pm 3,09$), может быть обусловлено потерями клеток из-за недостаточного содержания глицерина в растворе «Криосин» (в конечной концентрации 20%), которое не оказывает должного криопротекторного действия на клетки при температуре -80°C в условиях медленного регулируемого замораживания. Это обстоятельство требует проведения дополнительных исследований с использованием увеличенной конечной концентрации глицерина в криозащитном растворе (до 35–40%) для включения его в новый комплект, специально предназначенный для температуры -80°C .

Серия экспериментов по криоконсервированию при -40°C целых доз эритроцитов показала полное соответствие взвесей отмытых размороженных эритроцитов современным критериям пригодности данной среды. Так содержание гемоглобина в дозе деглицеринизированных эритроцитов, хранившихся при температуре -40°C , составило $49,5 \pm 1,88$ г, сохранность эритроцитов — $83,8 \pm 4,09$, содержание свободного гемоглобина — $0,16 \pm 0,029$ г/л, что позволяет рекомендовать способ криоконсервирования эритроцитов при -40°C для практического использования.

Литература

1. Волкова С. Д., Чеботкевич В. Н., Кирьянова Г. Ю. и др. Алгоритм обеспечения ЦМВ-негативными гемокомпонентами больных группы риска // Трансфузиология. 2015. Т. 16. № 1. С. 24–35.
2. Кирьянова Г. Ю., Волкова С. Д., Гришина Г. В. и др. Опыт разработки новых технологий для службы крови России // Medline.ru. 2013. Т. 14. С. 845–860. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art67.html>
3. Селиванов Е. А., Четкин А. В., Григорьян М. Ш., Макеев А. Б. Состояние и перспективы развития криоконсервирования эритроцитов в службе крови Российской Федерации // Трансфузиология. 2012. Т. 13, № 2. С. 14–20.
4. Вильянинов В. Н., Четкин А. В., Багаутдинов Ш. М., Копелец А. В. Становление, современное состояние и перспективы развития криоконсервирования клеток крови в России // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2005. № 2. С. 38–41.
5. Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Замораживание и криопротекция. В кн. «Биохимия мембран» / Под ред. А. А. Болдырева. — М.: Высшая школа, 1987. 80 с.
6. Руководство по общей и клинической трансфузиологии / Под ред. Ю. Л. Шевченко, В. Н. Шабалина, М. Ф. Заривчацкого, Е. А. Селиванова — СПб: Фолиант, 2003. 608 с.
7. Инструкция по криоконсервированию клеток крови, утв. МЗ РФ 29.05.1995 г.
8. Замалетдинова Т. В. Усовершенствование метода криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах / Дисс. ... канд. мед. наук. — Л., 1989. 194 с.
9. Bandarenko N., Cancelas J., Snyder E. L. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution (AS) — 5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system // Transfusion. 2007. V.47, No 4. P. 680–686.
10. Leikens C. C., de Korte D., Lagerberg J. W. Prolonged postthaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol // Vox Sang. — 2015. V. 108. No 3. P. 219–225.
11. Lagerberg J. W., Truijens-de Lange R., de Korte D. Altered processing of thawed red cells to improve the in vitro quality during postthaw storage at 4 degrees C // Transfusion. 2007. V. 47, No 12. P. 2242–2249.
12. Henkelman S., Noorman F., Badloe J. F. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine // Vox Sang. 2015. V. 108. No 2. P. 103–112.
13. Четкин А. В., Данильченко В. В., Волкова С. Д., Макеев А. Б., Солдатенков В. Е., Кирьянова Г. Ю., Касьянов А. Д., Голованова И. С. Организационные аспекты использования криоконсервирования эритроцитов в деятельности учреждений службы крови Российской Федерации // Вестник Международной академии холода. 2015. № 3. С. 45–49.

References

1. Volkova S. D., Chebotkevich V. N., Kiryanova G. U. et al. Algorithm to ensure the risk group patients with CMV-seronegative blood components. *Transfusiology*. 2015. V. 16, No 1. P. 24–35. (in Russian)
2. Kiryanova G. U., Volkova S. D., Grishina G. V. et al. Development experience of new technologies for Russian blood service. *Medline.ru*. 2013. V. 14. P. 845–860. [Electronic resource]. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art67.html>
3. Selivanov E. A., Chechetkin A. V., Grigorian M. Sh. et al. State and problems of cryopreservation of red blood cells in the blood service of the Russian Federation. *Transfusiology*. 2012. V. 13, No 2. P. 14–20. (in Russian)
4. Vilyaninov V. N., Chechetkin A. V., Bagautdinov Sh. M. et al. Emergence, state-of-the-art and outlooks of the cryopreservation of blood cells in Russia. *Probl. social hygiene, health and history of medicine*. 2005. No 2. P. 38–41. (in Russian)
5. Belous A., Gordienko E. A., Rozanov L. F. Freezing and cryoprotection // *Biochemistry of membranes*/ Ed. A. A. Boldyreva. Moscow, Vysshaya Shkola, 1987. 80 p. (in Russian)
6. Manual to common and clinical transfusion / edited by V. L. Shevchenko, Y. N. Shabalina, M. F. Zarivčackogo et al. St. Petersburg, 2003. 608 p. (in Russian)
7. Instruction for cryopreservation of blood cells. Approved by the MH of the RF 29.05.1995. (in Russian)

8. Zhamaletdinova T. V. Improvement of the method for red cell cryopreservation with moderately low temperatures / The dissertation of the candidate of medical sciences. Leningrad, 1989. 194 p. (in Russian)
9. Bandarenko N., Cancelas J., Snyder E. L. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution (AS) — 5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system. *Transfusion*. 2007. V. 47. No 4. P. 680–686.
10. Leikens C. C., de Korte D., Lagerberg J. W. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol // *Vox Sang*. 2015. V. 108. No 3. P. 219–225.
11. Lagerberg J. W., Truijens-de Lange R., de Korte D. Altered processing of thawed red cells to improve the in vitro quality during postthaw storage at 4 degrees C. *Transfusion*. 2007. V. 47. No 12. P. 2242–2249.
12. Henkelman S., Noorman F., Badloe J. F. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. *Vox Sang*. 2015. V. 108. No 2. P. 103–112.
13. Chechetkin A. V., Danilchenko V. V., Volkova S. D. et al. Organizational aspects of red blood cells cryopreservation in the activities of blood service in Russian Federation. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda*. 2015. No 3. P. 45–49.



<http://www.ifmo.ru>

Центр дополнительного профессионального образования Университета ИТМО

Лицензия на осуществление образовательной деятельности № 1008 от 20 мая 2014 года; серия 90Л101, № 0001077
Свидетельство о государственной аккредитации № 1021 от 17 июня 2014 г; серия 90А01, № 000188

Ежегодно в стенах Центра дополнительного профессионального образования (ЦДПО) по программам обучения, повышения квалификации, профессиональной переподготовки проходят обучение около 500 человек.

В их числе:

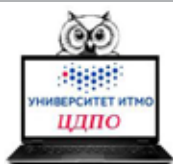
- ✓ руководители и специалисты госпредприятий профильных отраслей промышленности, в том числе из стран СНГ;
- ✓ работники предприятий малого и среднего бизнеса, специализирующиеся в области проектирования, монтажа и обслуживания холодильных машин и систем кондиционирования воздуха;
- ✓ работники предприятий малого и среднего бизнеса, специализирующиеся в области пищевой инженерии, пищевой биотехнологии и технологии продовольственных продуктов;
- ✓ научно-педагогические работники ВУЗов и ССУЗов России и стран СНГ;
- ✓ граждане России и стран СНГ, желающие освоить новые виды профессиональной деятельности или повысить квалификацию.

Центр осуществляет образовательную деятельность в соответствии с лицензией и свидетельством о государственной аккредитации по следующим направлениям:

- холодильные машины и установки;
- криогенные машины и установки;
- кондиционирование воздуха и климатехника предприятий;
- технология продовольственных продуктов;
- машины и аппараты пищевых производств;
- экономика и управление на предприятии;
- охрана труда и промышленная безопасность (по отраслям);
- промышленная экология;
- компьютерные курсы.

В настоящее время ЦДПО является признанным лидером в сфере дополнительного профессионального образования. Более подробная информация о видах и формах обучения; об условиях обучения, проживания и другая полезная информация представлена на официальном сайте.

<http://cdpo.ifmo.ru/ru/>



Контактная информация:

191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9
Тел./факс: (812) 314 -75-69, 571-52-14
E-mail: cdpo@irbt-itmo.ru