

УДК 615.361.018.52.014.43

## СВОЙСТВА КОМБИНИРОВАННОГО КОНСЕРВАНТА ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ТРОМБОЦИТНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

*К. А. Ветошкин\**, *С. В. Утемов*, *Ф. С. Шерстнев*, *А. А. Костяев*

*Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови,  
г. Киров, Россия*

## COMBINED PRESERVATIVE PROPERTIES USED TO FREEZE PLATELET PRESERVATIVES

*K. A. Vetoshkin, S. V. Utemov, F. S. Sberstnev, A. A. Kostyaev*

*Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation*

**Цель.** Определить свойства нового криоконсерванта на основе гексаметиленбистетраоксиэтилмочевины и диметилацетамида и его влияние на функциональную полноценность тромбоцитов.

**Материалы и методы.** Проведен анализ влияния различных вариантов криоконсерванта на функцию кровяных пластинок.

**Результаты.** Осмолярность исследуемых растворов составила от 184 до 750 мосм/л. При повышении концентрации компонентов растворов возрастала их осмолярность. Показатель кислотности (рН) готовых форм криоконсерванта составил 5,6–6,0, рН нативных тромбоцитных концентратов (ТК) – 7,32±0,12, а их осмолярность – 309,0±13,0 мосм/л. После смешивания суспензии клеток с растворами криофиликта рН тромбоцитных концентратов снижался от 7,0 до 6,2, осмолярность колебалась в пределах от 246,2±8,62 до 541,0±23,0 мосм/л, сохранялось 92,9–96,2% от исходного количества клеток, а их функциональная активность зарегистрирована на уровне 61,5–84% (от соответствующих показателей нативных ТК).

**Выводы.** Состав хладоограждающего раствора определяет физико-химические свойства самого криоконсерванта (рН, осмолярность), а также степень изменения морфофункциональной активности на этапе экспозиции ТК с криоконсервантом.

**Ключевые слова.** Криоконсервирование, тромбоцитный концентрат, рН, осмолярность, адгезия, агрегация, реакция на гипотонический шок.

**Aim.** To determine the properties of a new cryopreservative based on hexamethylentetraoxyethylurea (HMBTQEU) and dimethylacetamide (DMAC) and its effect on functional platelet ability.

**Materials and methods.** The effect of different variants of cryopreservative on the platelet function was analyzed.

**Results.** Osmolarity of the studied solutions was from 184 to 750 mosm/l. When the solution components' concentration increased their osmolarity grew. The acidity index (pH) of the prepared forms of cryopreservative was 5,6–6,0, pH of native platelet preservatives (PP) – 7,32±0,12 and their osmolarity – 309±13,0 mosm/l. After cell suspension was mixed with cryophylactic solutions, pH of platelet preservatives

© Ветошкин К. А., Утемов С. В., Шерстнев Ф. С., Костяев А. А., 2013

e-mail: kostyavetoshkin@yandex.ru

тел. 8 (332) 67 33 87

[Ветошкин К. А. (\*контактное лицо) – младший научный сотрудник лаборатории консервирования крови и тканей; Утемов С. В. – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории консервирования крови и тканей; Шерстнев Ф. С. – заведующий отделением гравитационной хирургии крови; Костяев А. А. – доктор медицинских наук, доцент, руководитель лаборатории консервирования крови и тканей].

decreased from 7,0 to 6,2, osmolarity ranged from  $246,2 \pm 8,62$  to  $541,0 \pm 23,0$  mosm/l; 92,9–96,2% of the basic amount of cells was preserved and their functional activity was registered at the level of 61,5–84% (of the corresponding native PP indices)

**Conclusion.** The composition of cold-protective solution determines physic-chemical properties of cryopreservative itself (pH, osmolarity) as well as the degree of changes in morphofunctional activity at the stage of PP exposition with cryopreservative.

**Key words.** Cryopreservation, platelet preservative, pH, osmolarity, adhesion, aggregation, response to hypotonic shock.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Создание эффективных методов долгосрочного хранения консервированных тромбоцитарных концентратов (ТК) является актуальным направлением исследований в области криобиологии и криомедицины. Криоконсервирование ТК позволяет решать проблему возросшей потребности в данной трансфузионной среде в гематологических стационарах. Сохранение при криоконсервировании достаточного количества функционально активных кровяных пластинок возможно лишь при использовании криопротекторов [4, 5].

В настоящее время перечень криофилактиков для замораживания и хранения ТК весьма ограничен. Для криоконсервирования ТК использовали такие криофилактики, как глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАЦ) [3, 9], гексаметиленбистетраоксиэтилмочевина (ГМБТОЭМ) [6, 7]. Однако большинство из них имеет существенные недостатки: так, глицерин требует отмывания от размороженной взвеси кровяных пластинок, ДМСО обладает высокой токсичностью. Считается, что для улучшения количественных и качественных показателей криоконсервированных тромбоцитов перспективно создание комбинаций проникающих и непроникающих протекторов. Нами проводятся исследования по разработке комбинированного криофилактика для ТК на основе криопротекторов ГМБТОЭМ и ДМАЦ.

Важными свойствами криозащитных растворов являются их физико-химические характеристики, а именно показатель ки-

слотности (рН), осмотические и криоскопические параметры. Изучение указанных свойств растворов позволяет объяснить влияние криоконсерванта на функциональную полноценность кровяных пластинок при смешивании их с криоконсервантом.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТК получали аппаратным способом с использованием сепараторов крови «Amicus Fenwall» (Baxter) и «MCS+», а также дискретным методом в отделении гравитационной хирургии крови клиники от доноров-добровольцев (с их информированного добровольного согласия). Всего изучено 138 образцов донорских ТК.

Смешивание ТК с раствором криоконсерванта проводили в соотношении 1:1 (по объему). Экспозиция с криофилактиком составляла 5–15 минут. Для определения показателя кислотности (рН) криоконсервирующих растворов и концентратов тромбоцитов использовали рН-метр – иономер «Эксперт-001». Осмолярность и криоскопическую точку оценивали с использованием прибора ОМТ-5 (осмометр – криоскоп) в хладоограждающих растворах, ТК и их смесях. Подсчет количества тромбоцитов проводили в камере Горяева в двух параллельных пробах.

Исследование функциональной активности тромбоцитов осуществляли непосредственно после получения ТК и после 5–15-минутной экспозиции с испытуемыми криоконсервантами. Определяли адгезию к стеклу по R. Marx [10], индуцированную агрегацию тром-

боцитов с АДФ (в концентрации 2,5 мкг/мл), адреналином (2,5 мкг/мл) фотометрическим методом с помощью лазерного агрегометра «Биола» модели LA – 230. Агрегатограммы регистрировали в течение 10 минут после добавления индукторов агрегации [1, 8]. Оценивали максимальную степень агрегации и средний радиус агрегатов. Реакцию на гипотонический шок (РГШ) определяли по методу R. I. Handin [10] с помощью спектрофотометра СФ-46 при длине волны 610 нм. Регистрацию оптической плотности пробы проводили в течение 10 минут, оценивали величину возврата названного показателя к исходному значению (%). Параметры агрегации и РГШ исследовали в пробах при стандартном количестве тромбоцитов 250 000–350 000 /мкл.

Сравнение полученных результатов выполняли с показателями нативных ТК. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью критерия Стьюдента [2].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные прописи криоконсерванта включали от 1 до 6% ГМБТОЭМ и от 1,25 до 4,5% ДМАЦ. Состав криофилактиков подбирали эмпирическим путем. Исследованы 6 вариантов комбинированного криоконсерванта, состав и физико-химические характеристики которых представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что при повышении концентрации компонентов растворов возрастала их осмолярность (от 184 до 750 мосм/л), наблюдалось снижение температуры замерзания растворов, определенной по криоскопической точке (от –0,327 до –1,402 °С).

Одним из важных свойств готовых форм ограждающих растворов является значение их рН. Оптимальным рН криофилактика для тромбоцитов считают 5,0–6,0. Во всех исследованных образцах рН криокон-

Таблица 1

### Состав и характеристики опытных вариантов растворов комбинированного криоконсерванта на основе ГМБТОЭМ и ДМАЦ

Компонент раствора, показатель	Вариант раствора					
	1	2	3	4	5	6
ГМБТОЭМ, %	1	2	2	4	6	5
ДМАЦ, %	1,25	1,75	2,5	3,5	4,0	4,5
рН	5,8	5,9	5,9	6,0	5,7	5,6
Осмолярность, мосм/л	184	279	373	600	744	750
Криоскопическая точка, °С	–0,327	–0,503	–0,697	–1,113	–1,382	–1,402

серванта составлял 5,6–6,0, т.е. не выходил за пределы рекомендованных значений (см. табл. 1).

Однако после смешивания донорских ТК с растворами криофилактика физико-химические свойства смеси могут изменяться в различной степени в зависимости от состава раствора. Результаты оценки физико-химических параметров клеточной суспензии после смешивания ТК с вариантами растворов приведены в табл. 2.

Известно, что показатель кислотности среды имеет важное значение для сохранности функциональных свойств тромбоцитов. При рН среды ниже 6,5 функциональная ак-

Таблица 2

### Физико-химические свойства донорских тромбоцитных концентратов после экспозиции с растворами консерванта

Параметр	Нативный донорский ТК	После экспозиции ТК с растворами					
		№1	№2	№3	№4	№5	№6
рН	7,32± ±0,12 (n=24)	7,05± ±0,07 (n=19)	6,77± ±0,08 (n=18)	6,76± ±0,11 (n=11)	6,5± ±0,1 (n=5)	6,3± ±0,1 (n=5)	6,2± ±0,1 (n=5)
Осмолярность, мосм/л	309,0± ±13,0 (n=13)	246,2± ±8,62 (n=13)	299,9± ±11,3 (n=13)*	350,8± ±19,5 (n=13)	439,0± ±7,1 (n=5)	536,4± ±22,3 (n=5)	541,0± ±23,0 (n=5)

Примечание: \*  $p > 0,05$  приведено в сравнении с исходными данными.

тивность кровяных пластинок подавляется [7].

Из указанных в табл. 2 данных видно, что рН суспензии клеток достоверно снизился после смешивания со всеми вариантами криоконсерванта ( $p < 0,05$ ). Однако менее всего рН ТК менялся при экспозиции с раствором №1, оставаясь близким к нейтральному значению ( $7,05 \pm 0,07$ ). После добавления в ТК образцов №2 и 3 показатель рН среды значительно уменьшался (до  $6,77 \pm 0,08$  – при варианте №2 и до  $6,76 \pm 0,11$  – при №3). Тем не менее показатель кислотности клеточной суспензии в смеси с указанными растворами оставался выше 6,5.

При экспозиции ТК с консервантами №4–6 происходило более значительное снижение рН клеточной суспензии: от  $6,5 \pm 0,1$  – с раствором №4 до  $6,2 \pm 0,1$  – при №6. То есть при смешивании концентратов кровяных пластинок с указанными криофилактиками рН суспензии клеток выходил за пределы критического значения 6,5.

Выявлено, что при 10-минутной экспозиции ТК с растворами №1 и 2 осмолярность суспензии клеток оставалась близкой к значению аналогичного показателя нативных ТК ( $309,0 \pm 13,0$  мосм/л). Осмолярность ТК с раствором №1 составила  $246,2 \pm 8,62$  мосм/л, с раствором №2 –  $299,0 \pm 11,3$  мосм/л, что соответствовало физиологическим значениям. При этом не было выявлено достоверного отличия осмолярности нативных ТК и концентрата кровяных пластинок, смешанного с образцом №2 ( $p > 0,05$ ). Растворы криоконсерванта №3–6 оказывали существенно большее влияние на донорские ТК, повышая осмолярность клеточной суспензии от  $350,8 \pm 19,5$  мосм/л (раствор №3) до  $541,0 \pm 23,0$  мосм/л (№6). Таким образом, наименьшее влияние на рН клеточной суспензии оказывали растворы №1, 2 и 3.

Осмолярность донорских ТК оставалась в физиологических границах при экспози-

ции концентратов кровяных пластинок с растворами №1 и 2. Варианты №4–6 вызывали существенное снижение показателя кислотности клеточной суспензии и повышение ее осмолярности. Такие изменения физико-химических свойств донорских ТК при смешивании с растворами криоконсерванта приводят к изменениям функциональных характеристик клеток.

Для оценки характера воздействия комбинированных растворов криопротекторов на функциональные свойства тромбоцитов на этапе экспозиции оценивали три параметра: адгезивную способность кровяных пластинок, степень агрегации тромбоцитов, индуцированную АДФ и адреналином, и величину РГШ. Указанные показатели считаются информативными и адекватными критериями, косвенно характеризующими сохранность гемостатической функции тромбоцитов (адгезия и агрегация) и их способность циркулировать в кровяном русле после переливания (РГШ). Было изучено влияние растворов криоконсерванта на сохранность кровяных пластинок и их функций до замораживания. Полученные результаты измерений, выраженные в процентном соотношении с соответствующими показателями нативных ТК, приведены в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, наименьшая сохранность количества клеток наблюдалась при экспозиции донорских ТК с раствором №2 –  $92,9 \pm 3,6\%$ . Наилучший показатель зарегистрирован при смешивании ТК с раствором №3 –  $96,2 \pm 3,8\%$ . Однако выявленное различие имело статистически недостоверный характер ( $p > 0,05$ ).

Установлено, что в результате экспозиции образцов ТК с исследуемыми растворами криоконсервантов показатели адгезии, агрегации тромбоцитов снижались. Степень их изменения определяется концентрацией криопротекторов в растворе. Так, наибольшее угнетение функциональных свойств тромбоцитов наблюдали при смешивании

Таблица 3

**Морфофункциональная сохранность  
донорских ТК при смешивании  
с криоконсервантом (%)**

Показатель	Вариант раствора						
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	
Количество тромбоцитов	93,5± ±4,0 (n=14)	92,9± ±3,6 (n=12)	96,2± ±3,8 (n=5)	93,3± ±3,8 (n=3)	95,5± ±3,7 (n=12)	95,8± ±2,2 (n=5)	
АДФ – индуцированная агрегация	Степень агрегации (по Born)	83,5± ±7,2 (n=5)	84± ±9,0 (n=5)*	69,0± ±20,9 (n=3)*	60,4± ±7,8 (n=3)	69,1± ±10,9 (n=3)	45,2± 23,4 (n=4)
	Средний радиус агрегатов	82,1± ±12,8 (n=6)	67,3± ±12,3 (n=5)*	79,6± ±6,9 (n=3)*	61,7± ±8,8 (n=3)	74,5± ±12,9 (n=3)	39,1± ±19,2 (n=4)
Адреналин-индуцированная агрегация	Степень агрегации (по Born)	80,3± ±15,1 (n=5)	87,6± ±8,0 (n=5)*	–	–	–	14,3± ±5,4 (n=3)
	Средний радиус агрегатов	80,8± ±7,7 (n=5)	70,4± ±7,2 (n=5)*	38,5– 40,3 (n=3)*	–	–	42,2± ±18,5 (n=3)
Адгезия к стеклу	77,8± ±16,6 (n=5)	75,9± ±12,8 (n=5)*	61,5± ±14,5 (n=3)*	49,5± ±6,5 (n=3)	38,5± ±10,9 (n=3)	20,4± ±8,5 (n=4)	
Реакция на гипотонический шок (10 минута)	98,1± ±1,6 (n=5)	97,0± ±2,6 (n=3)*	94,5± ±2,3 (n=3)	92,5± ±7,2 (n=4)	85,8± ±9,9 (n=3)	79,1± ±10,6 (n=3)	

Примечание: \*  $p > 0,05$ .

ТК с вариантами растворов №4 и 6. При экспозиции ТК с растворами №1, 2 и 3 зарегистрировано минимальное подавление агрегационной активности кровяных пластинок: в ответ на стимуляцию АДФ сохраняется до 80,3±15,1, 84,0±9,0 и 69,0±20,9% способности к образованию агрегатов соответственно ( $p > 0,05$ ). Средний радиус агрегатов остается в пределах 82,1±12,8% от исходного значения при использовании варианта раствора №1; 67,3±12,3% – варианта №2 и 79,6±6,9% – №3 ( $p > 0,05$ ).

Однако после смешивания клеточной суспензии с образцом №3 отмечено подавление адреналин-индуцированной агрегации вплоть до полного ее отсутствия. При использовании растворов №1 и 2 указанный показатель сохранялся соответственно в пределах 80,3±15,1% (раствор №1) и 87,6±8,0%

(раствор №2) от исходного. Размер агрегатов при этом составил 80,8±7,7 и 70,4±7,2% соответственно.

Степень угнетения адгезионной функции кровяных пластинок на этапе экспозиции изменялась с аналогичной закономерностью: наибольшее ингибирующее влияние на уровень данного показателя оказывали растворы №4–6 (20,4–49,5% от исходных значений), наименьшее – №1 и 2 (соответственно 77,8±16,6% и 61,5±14,5% от исходных значений).

Такое воздействие разных образцов консерванта на функциональную активность тромбоцитов можно объяснить различием физико-химических свойств растворов, например, значением pH. Агрегационная активность кровяных пластинок подавляется при pH среды ниже 6,5. Так, растворы №4–6, вызвавшие наибольшее снижение pH суспензии клеток, оказали значительное угнетающее влияние как на адгезию, так и на агрегацию кровяных пластинок. В то же время pH ТК при смешивании с растворами №1, 2 и 3 изменялся в наименьшей степени и оставался выше 6,5, что характеризовалось достаточно высокой функциональной активностью тромбоцитов на этапе экспозиции.

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, способность тромбоцитов отвечать на осмотическую нагрузку (РГШ) в наибольшей степени сохранилась при смешивании ТК с растворами №1, 2 и 3. Максимальное снижение показателей РГШ наблюдали при экспозиции ТК с вариантом криоконсерванта №6. Такое изменение способности кровяных пластинок к РГШ можно объяснить тем, что растворы №1–3 отличались наименьшей осмолярностью в ряду опытных образцов, поскольку концентрация активных компонентов была существенно ниже, чем в прописях №4–6. При смешивании концентрата клеток с криофилактиками №1–3 осмотическое давление донорских ТК оставалось в пределах физиологической нормы. В то же время раствор №6 обладал наибольшей осмолярно-

стью, так как концентрация веществ, входящих в его состав, значительно превышает таковую в остальных образцах. Растворы №4 и 5 также подавляли способность кровяных пластинок противостоять водной нагрузке, но степень этого снижения была различной.

### Выводы

1. Состав хладоограждающего раствора определяет физико-химические свойства криоконсерванта и величину изменения аналогичных параметров клеточной суспензии на этапе экспозиции.

2. Наименьшее влияние на функциональные свойства тромбоцитов и их осмотическую резистентность оказывали растворы №1 и 2, имевшие наименьшую концентрацию основных составляющих компонентов. При смешивании с этими консервантами рН суспензии клеток оставался в пределах от 6,77 до 7,05, осмолярность не выходила за пределы физиологических значений.

3. На этапе экспозиции с растворами №1 и 2 сохранялось 92,9–96,2% от исходного количества клеток, а их функциональная активность оставалась на уровне 61,5–84%. Именно эти растворы можно считать наиболее перспективными для дальнейшего изучения криоконсервирующей способности.

### Библиографический список

1. *Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю.* Новый высокочувствительный метод ана-

- лиза агрегации тромбоцитов. Лабораторное дело 1989; 10: 15–18.
2. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М: Практика 1999; 459 с.
3. *Захаров В.В.* Консервирование тромбоцитов замораживанием при –80 °С под защитой диметилацетамида: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб. 1996; 32 с.
4. *Комтаниец А.М.* Функциональная полноценность тромбоцитов, сохраняемых при различных температурных режимах: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 1980; 22 с.
5. *Сведенищев Е.П.* Криоконсерванты для живых клеток. Сыктывкар 2010; 80 с.
6. *Селезнёва О.М.* Криоконсервирование тромбоцитов с применением нового ограждающего раствора: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб. 1996; 21 с.
7. *Цуцаева А.А.* Криоконсервирование клеточных суспензий. Киев: Наукова думка 1983; 240 с.
8. *Born G.V.R.* Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets. J. Physiol. (Lond.) 1962; 67–68.
9. *Djerassi I, Roy A, Kim J, Cavins J.* Dimethylacetamide, a New Cryoprotective Agent for Platelets. Transfusion 1971; 11 (2): 72–76.
10. *Marx R, Derlath S.* Never eine Method zur vergleichend quantitativen Bestimmung der thrombocyten adhesivitat an blutfremden overflachen. Blut. 1957; 3: 247–254.

Материал поступил в редакцию 17.09.2013