

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 тромбоцитных 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 adhasivitat an blutfremden overflachen. Blut. 1957; 3: 247–254.

Материал поступил в редакцию 17.09.2013