

Изобретение относится к криобиологии и может быть использовано в научно-исследовательских и клинических лабораториях при исследовании свойств эритроцитов.

Жизнедеятельность эритроцитов осуществляется с участием ионтранспортных систем мембраны, поэтому сохранение структурно-функциональных свойств плазматических мембран эритроцитов в процессе консервирования клеток является актуальной проблемой.

Известны способы хранения эритроцитов под защитой различных криопротекторов полиэтиленоксида (Ас. СССР №560613, кл. А61К35/18, 1977), этиленгликоля (Ас. СССР №596202, кл. А01Н1/02, 1978), 1,2-пропандиола (Патент РФ №888896, кл. А01Н1/02, 1980).

Однако недостатком этих способов является то, что после переноса эритроцитов из криоконсервирующего раствора в физиологический, активность транспортных мембранных систем нарушается и их дальнейшее использование для исследования активного транспорта становится невозможным.

Идеальным препаратом мембран для изучения катионного транспорта являются тени эритроцитов. Поэтому актуальной проблемой является создание способов хранения теней эритроцитов.

Наиболее близким к заявляемому является способ хранения теней эритроцитов при 4°C (Лишко В.К. Тени эритроцитов как модель изучения активного транспорта  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . - Транспортные аденозинтрифосфатазы. - М.: МГУ, 1977. - С.141 - 145).

Согласно этому способу эритроциты, отмытые от плазмы и других форменных элементов крови, помещают в гипотонический раствор соли при 4°C. Соотношение клетки : раствор 1 : 4. Полученные таким образом тени эритроцитов реставрируют путем доведения концентрации солевого раствора до изотонической. Затем удаляют гемоглобин из внеклеточного пространства и помещают на хранение в изотоническом солевом растворе при 4°C.

Недостатком способа является то, что он позволяет хранить тени без существенного изменения проницаемости мембран только в течение 2 - 3 суток. В случае же использования теней для изучения активного транспорта их можно хранить в таких условиях только 6 - 12 часов, т.к. при более длительном сроке хранения происходит гидролиз внутриклеточной АТФ.

Задачей изобретения является создание такого способа хранения теней эритроцитов, в котором изменение температуры и среды хранения позволило бы стабилизировать мембраны, сохранить ионотранспортные ферменты и таким образом обеспечить увеличение сроков сохранения транспортных свойств мембран теней эритроцитов.

Поставленная задача решается тем, что в способе хранения теней эритроцитов путем помещения их на холод в солевой среде, тени помещают в жидкий азот в среде, содержащей эндогенный гемоглобин.

Способ осуществляют следующим образом.

Отмытые от плазмы и других форменных элементов крови эритроциты лизируют при 4°C в гипотоническом растворе, содержащем 10мМ трис HCl (pH 7,4) и 4мМ  $\text{MgCl}_2$  при соотношении клетки : раствор 1 : 4. Затем тени концентрируют центрифугированием при 10000q в течение 10мин и непосредственно в этой среде, содержащей эндогенный гемоглобин в полиэтиленовых пробирках помещают в жидкий азот (-196°C). Перед

использованием тени отогревают при 40°C в водяной бане и реставрируют 3М KCl, доводя тоничность до 150мМ. Гемоглобин удаляют путем центрифугирования при 10000q в течение 10мин.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. Тени эритроцитов получали путем гемолиза эритроцитов в гипотоническом растворе, содержащем 10мМ трис-HCl, pH 7,4 и 4мМ  $\text{MgCl}_2$  при отношении эритроциты : гипотонический раствор 1 : 4. Затем половину проб центрифугировали, удаляли надосадок, содержащий гемоглобин. Осадок теней эритроцитов суспендировали в гипотоническом растворе. Все пробы, содержащие гемоглобин и без гемоглобина, погружали в жидкий азот и хранили при -196°C в течение 1 недели, 1 месяца, 1 года. Размораживали в водяной бане при 42°C. После этого тени реставрировали, добавляли к ним 3М KCl до изотонической концентрации 150мМ. После удаления гемоглобина исследовали транспорт  $^{86}\text{Rb}$  в реставрированных тенях эритроцитов (Гулевский А.К. и др. Транспорт одновалентных катионов в эритроцитах при инкубации в защитных средах // Криобиология. - 1985. - №3. - С.24 - 28). Результаты представлены в табл.1.

Данные представлены в мМ  $\text{Rb}^+/\text{л}$  эритроцитов за 1 час инкубации при 37°C.

Из табл.1 видно, что- хранение теней эритроцитов в среде эндогенного гемоглобина при -196°C является более благоприятным по сравнению с хранением при -196°C без гемоглобина, т.к. общий и АТФ - зависимый транспорт в тени эритроцитов незначительно отличается от контроля.

Пример 2. Тени эритроцитов получали как в примере 1, хранили при 4°C с гемоглобином и без гемоглобина в течение 6 часов, 3 суток и 7 суток. После гипотермического хранения, реставрации и удаления гемоглобина в половине проб исследовали транспорт  $^{86}\text{Rb}$ . Результаты представлены в табл.2.

Из табл.2 видно, что способ хранения теней эритроцитов при 4°C как в присутствии гемоглобина, так и без него приводит уже на 3 - 5 сутки хранения к потере мембранными тенями эритроцитов нативных свойств, которые еще более усугубляются к 7 - м суткам хранения.

Пример 3. Тени эритроцитов получали, как описано в примере 1. Одну половину образцов хранили при -196°C в присутствии гемоглобина, а другую отмывали от гемоглобина и хранили при +4°C в холодильнике. Образцы которые хранили при -196°C, размораживали, реставрировали, отмывали от гемоглобина и исследовали в них состояние транспорта  $^{86}\text{Rb}$ , как описано в примере 1. Аналогично исследовали тени эритроцитов, хранившиеся при +4°C. Результаты представлены в табл.3.

Из табл.3 видно, что при хранении теней эритроцитов при -196°C в присутствии гемоглобина общий транспорт  $\text{Rb}$  в клетки остается на уровне контроля, незначительно повышается пассивная проницаемость  $\text{Rb}$ , активный вход  $\text{Rb}$ , который осуществляет  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФаза}$ , повреждается в незначительной степени при все сроках хранения, что свидетельствует о сохранении структурно-функциональных свойств мембраны, в частности  $\text{Na}^+$  - насоса. При хранении теней эритроцитов известным способом уже через 1 неделю хранения активный перенос  $\text{Rb}^+$  полностью отсутствует, существенно повреждается общий транспорт  $\text{Rb}^+$  и пассивная проницаемость мембран для катиона.

Таким образом, приведенные примеры свидетельствуют о том, что заявляемый способ хранения тений эритроцитов обеспечивает длительное их хранение без потери мембранами структурно-функциональных свойств.

# Транспорт $^{86}\text{Rb}$ в тениях эритроцитов после хранения в среде при $4^{\circ}\text{C}$ и $-196^{\circ}\text{C}$

$n = 10$

## Транспорт $^{86}\text{Rb}$ в тениях эритроцитов в зависимости от времени хранения в среде при $4^{\circ}\text{C}$

$n = 10$

Сроки хранения		Контроль		Хранение в среде при $4^{\circ}\text{C}$ с гемам				
		мм Rb	опыт	мм				
			контроль, %					
1 неделя	1	$10,6\pm0,7$	100	$12,4\pm0,5$	контроль	1	$10,6\pm0,7$	100
	2	$6,6\pm0,4$	100	$9,5\pm0,4$		2	$6,6\pm0,4$	100
	3	$4,0\pm0,6$	100	$2,9\pm0,3$		3	$4,0\pm0,6$	100
	1	—	—	$12,1\pm0,4$	1 неделя	1	$4,6\pm0,2$	100
	2	—	—	$9,8\pm0,3$		2	$4,7\pm0,2$	43
	3	—	—	$3,1\pm0,2$		3	0	71
1 месяц	1	—	—	$11,9\pm0,3$	1 месяц	1	0	0
	2	—	—	$9,1\pm0,2$		2	0	0
	3	—	—	$3,1\pm0,2$		3	0	0
1 год	1	—	—	$12,5\pm0,4$	1 год	1	0	0
	2	—	—	$9,2\pm0,3$		2	0	0
	3	—	—	$2,9\pm0,2$		3	0	0

1 – общий вход  $^{86}\text{Rb}$  в тении эритроцитов;

2 – уровень пассивной проницаемости мембран для  $^{86}\text{Rb}$ ;

3 – активный (АТФ – зависимый) транспорт  $^{86}\text{Rb}$  в тении эритроцитов.

Т а б л и ц а 2

## Транспорт $^{86}\text{Rb}$ в тениях эритроцитов после хранения при $4^{\circ}\text{C}$

$n = 10$

Сроки хранения		Хранение при $-4^{\circ}\text{C}$ без гемоглобина		Хранение при $-4^{\circ}\text{C}$ с гемоглобином	
		мм	опыт контроль, %	мм	опыт контроль, %
0 (контроль)	1	$10,6 \pm 0,7$	100	$11,2 \pm 0,9$	100
	2	$6,6 \pm 0,4$	100	$6,9 \pm 0,5$	100
	3	$4,0 \pm 0,6$	100	$4,3 \pm 0,4$	100
6 часов	1	$9,8 \pm 0,3$	92	$10,3 \pm 0,4$	92
	2	$8,1 \pm 0,5$	123	$7,6 \pm 0,3$	110
	3	$1,7 \pm 0,2$	43	$2,7 \pm 0,3$	63
3 суток	1	$8,8 \pm 0,4$	83	$6,5 \pm 0,5$	58
	2	$8,6 \pm 0,5$	131	$6,0 \pm 0,4$	87
	3	$0,2 \pm 0,1$	5	$0,5 \pm 0,2$	12
7 суток	1	$4,6 \pm 0,2$	43	$2,7 \pm 0,3$	24
	2	$4,7 \pm 0,2$	71	$2,6 \pm 0,2$	38
	3	0	0	0,1	2