

Изобретение относится к криобиологии, а именно низкотемпературному консервированию эритроцитов, и может быть использовано на станциях переливания крови.

Известен способ криоконсервирования эритроцитов при (-70Н-80)°С с использованием криоконсерванта, содержащего глицерин, маннит, фосфорнокислый натрий и воду бидистиллированную, который добавляют к эритромассе в соотношении 1:1 [1].

Недостатком способа является его трудоемкость, связанная с необходимостью проведения 4-х отмывок, поскольку глицерин является токсичным ( $DL_{50}=7,35$  г/кг при внутрибрюшинном введении крысам 20%-ного раствора [2]).

Наиболее близким к заявляемому является способ криоконсервирования эритроцитов, согласно которому к эритромассе в соотношении 2:1 добавляют криоконсервант, содержащий диметилсульфоксид (ДМСО), поливинилпирролидон м.м. 12600 (ПВП-12600), глюкозу, фосфорнокислый натрий, хлористый калий и воду бидистиллированную, после чего замораживают и хранят при умеренно низких температурах.

Недостатком способа является то, что он требует больших затрат труда и средств, что связано с использованием больших объемов криоконсерванта по отношению к эритромассе.

Кроме этого в способе используется токсичный препарат ДМСО ( $DL_{50} = 12,9$  г/кг при внутрибрюшинном введении крысам 25%-ного раствора [4]).

В основу изобретения поставлена задача создания такого способа криоконсервирования эритроцитов, в котором путем изменения состава криоконсерванта обеспечивается возможность уменьшения его расхода и за счет этого снижение трудоемкости способа и затрачиваемых на его осуществление средств.

Эта задача решается тем, что в способе криоконсервирования эритроцитов, включающем добавление к эритромассе криоконсерванта, содержащего поливинилпирролидон молекулярной массы 12600 (ПВП-12600) и воду бидистиллированную (б/д) с последующим замораживанием и хранением при умеренно низких температурах, криоконсервант дополнительно содержит 1,2-пропанолиол (1,2 ПД), сахарозу и натрия хлорид, причем добавляют его к эритромассе в соотношении (0,3-1): 1 до конечной концентрации 1.2ПД в надосадке 23-42%, а компоненты берут в следующем соотношении, %:

<b>1,2ПД</b>	<b>35-75</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>8-16</b>
<b>Сахароза</b>	<b>2-6</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,4-0,9</b>
<b>Вода б/д</b>	<b>остальное</b>

Применение криоконсерванта нового состава позволяет использовать его на одну и ту же дозу эритромассы в 3-5 раз меньше, чем в прототипе.

В табл. 1 приведены объемы растворов, с которыми приходится работать при дозе крови от одного донора 500 мл (250 мл эритромассы).

Из табл. 1 видно, что при осуществлении заявляемого способа необходимо работать с меньшими объемами растворов, в связи с чем снижаются в 2-5 раз трудозатраты на приготовление и разлив растворов, обработку и стерилизацию емкостей, загрузку-выгрузку холодильников, стерилизационных камер, транспорта. Соответственно снижаются в затрачиваемые на это средства. Кроме этого, криоконсервант разработан на основе малотоксичного 1.2ПД ( $DL_{50} = 23,4$  при внутрибрюшинном введении крысам [2], что снижает ее токсичность [5].

Способ осуществляют следующим образом.

Эритроциты центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20-25 мин, удаляют надосадок и к эритромассе в соотношении (0,3-1,0): 1 добавляют криоконсервант, содержащий, %

<b>1,2ПД</b>	<b>35-75</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>8-16</b>
<b>Сахароза</b>	<b>2-6</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,4-0,9</b>
<b>Вода б/д</b>	<b>остальное</b>

Конечная концентрация 1.2ПД в надосадке после добавления должна составлять 23-42%.

Полученную суспензию помещают в электрохолодильник. Отогрев проводят на водяной бане (41-45°С) до комнатной температуры. После отогрева отмывают и переводят в раствор 8°.

Пример 1. Эритроциты центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин, удаляли надосадок и к 125 мл эритромассы добавляли 50 мл (1:0,4) криоконсерванта, содержащего, мас. %

<b>1,2ПД</b>	<b>65</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>14</b>
<b>Сахароза</b>	<b>2</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,6</b>
<b>Вода б/д</b>	<b>остальное</b>

Конечная концентрация 1.2ПД составляла 27%.

Суспензию в полимерном мешке одноразового использования помещали в электрохолодильник. После замораживания до -70°С суспензию размораживали на водяной бане при 45°С.

**Отмывку проводили растворами [3]:**

<b>№ 1 Сорбитол</b>	<b>8%</b>
<b>Натрия хлорид</b>	<b>7%</b>
<b>№ 2 Сорбитол</b>	<b>3%</b>
<b>Натрия хлорид</b>	<b>1%</b>

К 175 мл суспензии добавляли 75 мл раствора № 1 и 250 мл раствора № 2. После 10 мин

центрифугирования при 1500 об/мин удаляли надосадок и к эритроmasсе добавляли 375 мл раствора № 2 (1:3). После центрифугирования при 1500 об/мин удаляли надосадок и эритроциты переводили в раствор 8<sup>B</sup> (1:3).

Результаты представлены в табл.2.

Из табл.2 видно, что сохранность эритроцитов после криоконсервирования заявляемым способом не ниже, чем в прототипе.

Пример 2. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли к эритроmasсе в соотношении 1:1 при следующем соотношении компонентов, %

<b>1,2ПД</b>	<b>35</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>8</b>
<b>сахароза</b>	<b>2</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,4</b>
<b>вода б/д</b>	<b>остальное</b>

После отмывки общие потери составили  $11,4 \pm 1,6\%$ , гемолиз в растворе 8<sup>e</sup> через 24 ч  $-1,0 \pm 0,1\%$ .

Пример 3. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли 1:1 при следующем соотношении компонентов, %

<b>1,2ПД</b>	<b>32</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>6</b>
<b>Сахароза</b>	<b>1</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,3</b>
<b>Вода б/д</b>	<b>остальное</b>

После отмывки общие потери 58,0 4,0%, в суспензии много стромы. Таким образом если компоненты среды брать в количествах, ниже заявляемых, резко увеличиваются потери клеток.

Пример 4. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли 0,5:1 при следующем соотношении компонентов, %

<b>1,2ПД</b>	<b>75</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>16</b>
<b>Сахароза</b>	<b>2</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,9</b>
<b>Вода б/д</b>	<b>остальное</b>

После отмывки общие потери -  $11,4 \pm 0,5\%$ , гемолиз в растворе 8<sup>B</sup> через 24 часа  $-0,6 \pm 0,1\%$ .

Пример 5. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли 0,5:1 при следующем соотношении компонентов, %

<b>1,2ПД</b>	<b>75</b>
<b>ПВП-12600</b>	<b>10</b>
<b>Сахароза</b>	<b>6</b>
<b>NaCl</b>	<b>0,9</b>
<b>Вода б/д</b>	<b>остальное</b>

После отмывки общие потери  $14,5 \pm 1,5\%$ , гемолиз в растворе 8<sup>B</sup> через 24 ч  $0,7 \pm 0,1\%$ . Поскольку увеличение содержания любого компонента среды, приведенной в примере 4, на 1 г приводит к потере растворимости, содержание сахарозы было увеличено за счет уменьшения количества ПВП. Таким образом максимальные количества компонентов криоконсерванта определяются их растворимостью.

Пример 6. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что изменяли конечную концентрацию 1,2ПД в надосадке, которую определяли методом Н-ЯМР (точность определения  $\pm 0,1\%$ ).

Результаты представлены в табл.3.

Из табл. 3 видно, что при концентрациях 1,2ПД в надосадке выше 42% и ниже 23% эритроциты теряют свою полноценность и не пригодны для переливания.

Пример 7. Для проверки влияния неконтролируемого размораживания на сохранность эритроцитов проводили трехразовое циклирование температуры  $(-30)-(+85)^{\circ}\text{C}$  при различных количествах ПВП, минимальной (35%) концентрации 1,2ПД. Содержание сахарозы - 2%, NaCl - 0,6%.

Результаты представлены в табл.4.

Из табл.4 видно, что возможные случайные отогревы холодильника мало влияют на сохранность эритроцитов.

Пример 8. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Эритроmasсу хранили в холодильнике в течение 10 мес. в гема-коновских полимерных мешках. После отогрева и отмывки общие потери составили  $10,9 \pm 1,6\%$ . Гемолиз в растворе 8<sup>B</sup> через 24ч  $-0,8 \pm 0,2\%$ . Остаточный 1,2ПД меньше 0,1%. Эритроциты имели нормальную форму и более 90% клеток образовывали монетные столбики, поглощали кислород.

Таблица 1

Виды работ	Объемы растворов	
	Прототип	Предлагаемый способ
1. Приготовление и добавление криоконсерванта	500 мл	100 мл
2. Разлив в емкости для помещения в холодильник	2 емкости	1 емкость
3. Отогрев одной дозы крови	2 емкости	1 емкость
4. Разлив при отмывке	4 емкости	2 емкости

Продолжение табл. 1

Виды работ	Объемы растворов	
	Прототип	Предлагаемый способ
5. Добавление отмывочных растворов:		
при I отмывке		
№ 1	200 мл	150 мл
№ 2	1000 мл	500 мл
при II отмывке		
№ 2	1400–1600 мл	380–450 мл

Таблица 2

Сохранность эритроцитов после криоконсервирования  
n = 6

Показатели	Способ криоконсервирования	
	Прототип	Изобретение
Общие потери, %	9,7±1,4	7,2±0,4
Гемолиз в р-ре 8 <sup>в</sup> через 24 часа, %	1,2±0,1	1,1±0,1

Таблица 3

Сохранность эритроцитов в зависимости от конечной концентрации 1,2 ПД в надосадке

n = 6

Соотношение криоконсервант : эритро- ромасса	0,45:1	0,65:1	0,8:1	1:1	0,28:1	0,36:1	0,4:1	0,5:1	0,6:1	0,7:1	0,8:1	1:1
Конечная концентрация 1,2 ПД в надосадке, %	15	18	20	23	25	28	31	35	39	42	45	49
Общие потери, %	92,5±3,5	63,7±2,1	45,0±3,0	38,7±4,1	25,0±1,3	15,3±3,2	13,0±0,3	11,4±0,5	19,5±0,3	23,2±1,3	67,6±1,6	95,2±4,2
Гемолиз в растворе 8 <sup>в</sup> через 24 ч, %	–	–	–	0,7±0,1	0,5±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	0,6±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	–	–
Примечание		много стромы	много стромы								много стромы	

Т а б л и ц а 4

Сохранность эритроцитов после 3-разового циклирования температуры

n = 6

Концентрация ПВП-12600	0	3	6	8	12	16
Гемолиз, %	25,4 $\pm$ 0,6	21,3 $\pm$ 1,6	9,6 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,4