

Изобретение относится к криобиологии.

Наиболее близким к заявляемому является способ консервирования тромбоцитов путём замораживания их со скоростью 37 град./мин до -196°C под защитой 0,5 М (4,6 %) глицерина и последующего отогрева на водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$ [1].

Недостатком способа консервирования тромбоцитов под защитой глицерина является снижение устойчивости тромбоцитов к гипотоническому шоку (18 ± 2 %).

Задачей изобретения является создание такого способа консервирования тромбоцитов, в котором изменение режима замораживания и концентрации криопротектора или замена его другими позволили бы повысить устойчивость клеток к гипотоническому шоку и за счет этого обеспечить сохранность функциональной полноценности.

Для решения этой задачи в способе консервирования тромбоцитов, включающем замораживание их до -196°C в защитной среде, содержащей криопротектор глицерин согласно изобретению глицерин берут в концентрации 5-7 % или используют криопротектор 1,2-пропандиол в концентрации 2-3 %, а замораживание осуществляют сначала со скоростью 1-2 град/мин до температуры кристаллизации защитной среды, далее со скоростью 0,4-0,6 град/мин до $(-6) - (-7)^{\circ}\text{C}$ и затем со скоростью 5-10 град/мин до $(-80) - (-196)^{\circ}\text{C}$.

Пример 1. Концентрат тромбоцитов получали методом дифференцированного центрифугирования крови, заготовленной в пластиковые контейнеры "Гемакон". Из 500 мл крови получали один тромбоконцентрат (ТК), содержащий $0,6-0,8 \cdot 10^{11}$ тромбоцитов в 20-25 мл плазмы. Непосредственно перед замораживанием готовили растворы криопротекторов на аутологической плазме с pH 6,5. При необходимости объединяли 3-4 ТК от доноров, идентичных по группе крови и резус-принадлежности. Перед замораживанием к суспензии ТК медленно, постоянно перемешивая, со скоростью 0,3 мл/мин добавляли равный объем криопротектора глицерина или 1,2-пропандиола в разных концентрациях. Время экспозиции тромбоцитов в защитном растворе при $20-22^{\circ}\text{C}$ - 30 мин. Затем клеточную взвесь реализовали в контейнеры и помещали в камеру программного охлаждающего устройства УОП 6 6.000.000 производства ОП ИПКиКАН УССР. Замораживание осуществляли со скоростью $2,0^{\circ}/\text{мин}$ до температуры замораживания защитного раствора, при которой инициировалось льдообразование внеклеточной воды, с этого момента со скоростью $0,5^{\circ}/\text{мин}$ до -6°C , затем $7^{\circ}/\text{мин}$ до -196°C , погружали в жидкий азот. Отогрев производили в водяной бане при 37°C . Образцы из контейнеров переводили в пластиковые мешки, 30-40 мин термостатировали при 37°C , затем 10 мин центрифугировали, надсадок удаляли и к оставшимся тромбоцитам осторожно приливали аутологическую плазму с температурой 37°C .

Для оценки сохранности гемостатической функции деконсервированных тромбоцитов исследовали их агрегационную активность под воздействием АДФ, реакцию на гипотонический шок и ретракционную активность. В каждом опыте проводили 5 повторов, в которых анализировали по 7 контейнеров. Статистическую обработку проводили по методу Фишера-Стьюдента.

Результаты исследований приведены в таблицах 1-8.

Оптимальная концентрация глицерина 5-7,5 %, 1,2-пропандиола - 2,3 % (табл. 1).

Пример 2. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Концентрация глицерина в ТК-5 %, 1,2-пропандиола - 2,5 %. Скорость охлаждения до температуры кристаллизации варьировали (таблица 2).

Оптимальная скорость охлаждения на I этапе - $1-2^{\circ}$ мин.

Пример 3. Способ осуществляли как в примере 1, концентрация криопротекторов глицерина и 1,2-ПД 5 % и 2 %, соответственно, конечную температуру 1-го этапа варьировали (таблица 3).

Оптимальной конечной температурой I этапа является температура кристаллизации, которая лежит в пределах от $-1,0$ до $-1,5^{\circ}\text{C}$. При охлаждении тромбоцитов на I этапе до температуры ниже точки кристаллизации защитного раствора создается начальное переохлажденное состояние внеклеточного раствора, в результате кристаллизации происходит разогрев всей суспензии до этой температуры, не выдерживается оптимальная скорость охлаждения, как следствие, ухудшение сохранности гемостатической функции, а также уменьшение их количества, снижение показателей ретракции, реакции на гипотонический шок.

Пример 4. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Концентрация глицерина в ТК 5 %, 1,2-ПД - 2,5 %. Варьировали скорость охлаждения от температуры кристаллизации до -6°C (таблица 4).

Из представленных данных следует, что оптимальные скорости охлаждения на 2 этапе $0,4-0,6^{\circ}/\text{мин}$.

Пример 5. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Концентрация глицерина 5 %, 1,2-ПД - 2,5 %. Варьировали конечную температуру 2 этапа охлаждения (таблица 5).

Оптимальная конечная температура 2 этапа $(-6) - (-7)^{\circ}\text{C}$.

Пример 6. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Концентрация глицерина 5 %, 1,2-ПД - 2,5 %. Варьировали скорость 3 этапа, конечная температура которого была -196°C . Оптимальная скорость 3 этапа - $5-10^{\circ}/\text{мин}$ (таблица 6).

Пример 7. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Концентрация глицерина 5 %, 1,2-ПД - 2,5 %. Варьировали конечную температуру 3 этапа.

Оптимальная конечная температура 3 этапа $(-80) - (-196)^{\circ}\text{C}$ (таблица 7).

Пример 8. Способ осуществляли аналогично примеру 1 и по прототипу (таблица 8). Данные сохранности тромбоцитов в зависимости от способа консервирования говорят о том, что в случае консервирования заявляемым способом показатели реакции на гипотонический шок, ретракции и агрегации достоверно выше, чем в прототипе.

Таблица 1

Показатели	Содержание глицерина, %								Содержание 1,2-пропандиола, %							
	3,0	4,0	4,5	5,0	6,5	7,5	8,0	10,0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	5,0
АДФ-агрегация, %	10 ± 4	17 ± 4	23 ± 3	30 ± 3	35 ± 3	36 ± 3	15 ± 3	7 ± 3	7 ± 4	8 ± 3	26 ± 2	25 ± 2	24 ± 3	18 ± 3	11 ± 2	7 ± 3
Количество сохранившихся клеток, %	71 ± 3	72 ± 2	72 ± 2	77 ± 2	79 ± 2	75 ± 2	75 ± 2	70 ± 3	68 ± 5	75 ± 4	88 ± 3	87 ± 2	85 ± 2	82 ± 3	77 ± 3	71 ± 3
Ретракция, %	39 ± 6	44 ± 5	58 ± 2	74 ± 2	73 ± 3	72 ± 2	54 ± 3	40 ± 2	15 ± 5	60 ± 3	76 ± 3	75 ± 2	77 ± 2	67 ± 2	35 ± 2	26 ± 8
Реакция на гипотонический шок, %	9 ± 3	12 ± 4	21 ± 3	35 ± 3	36 ± 3	38 ± 3	17 ± 2	7 ± 3	0,0	10 ± 3	28 ± 2	30 ± 3	28 ± 3	21 ± 3	12 ± 4	0,0

Таблица 2

Показатели	Криопротектор	Скорость охлаждения I этапа, °/мин							
		0,3	0,5	0,8	1,0	2,0	2,5	3,0	5,0
АДФ-агрегация, %	Глицерин 1,2 - ПД	8 ± 3 4 ± 3	12 ± 4 8 ± 3	21 ± 3 17 ± 3	33 ± 2 27 ± 3	30 ± 3 25 ± 2	25 ± 2 20 ± 2	18 ± 2 12 ± 3	13 ± 3 8 ± 3
Количество сохранившихся клеток, %	Глицерин 1,2 - ПД	68 ± 2 78 ± 2	71 ± 3 78 ± 2	70 ± 2 82 ± 2	75 ± 2 83 ± 3	77 ± 2 87 ± 2	75 ± 2 85 ± 2	70 ± 3 77 ± 3	71 ± 3 79 ± 2
Ретракция, %	Глицерин 1,2 - ПД	55 ± 2 49 ± 2	58 ± 2 47 ± 2	65 ± 3 60 ± 2	76 ± 2 72 ± 3	74 ± 2 75 ± 2	72 ± 3 70 ± 2	64 ± 2 61 ± 3	52 ± 2 46 ± 3
Реакция на гипотонический шок, %	Глицерин 1,2 - ПД	7 ± 4 5 ± 3	14 ± 2 10 ± 3	23 ± 3 24 ± 2	36 ± 2 32 ± 2	35 ± 3 30 ± 3	29 ± 3 26 ± 2	19 ± 2 15 ± 2	12 ± 3 10 ± 3

Таблица 3

Показатели	Криопротектор	Скорость охлаждения I этапа, %							
		+5,0	+2,0	0,0	-1,0	-1,5	-2,0	-3,0	-5,0
АДФ-агрегация, %	Глицерин	13 ± 4	14 ± 3	20 ± 3	22 ± 3	30 ± 3	26 ± 4	11 ± 5	6 ± 4
	1,2 - ПД	8 ± 3	10 ± 3	15 ± 2	18 ± 2	25 ± 2	19 ± 3	13 ± 4	5 ± 4
Количество сохранившихся клеток, %	Глицерин	70 ± 5	73 ± 3	75 ± 2	80 ± 3	77 ± 2	70 ± 3	71 ± 3	56 ± 3
	1,2 - ПД	75 ± 3	78 ± 4	83 ± 3	85 ± 2	87 ± 2	82 ± 3	78 ± 4	67 ± 3
Ретракция, %	Глицерин	50 ± 4	57 ± 3	68 ± 2	70 ± 2	74 ± 2	71 ± 2	58 ± 3	47 ± 4
	1,2 - ПД	43 ± 3	48 ± 3	65 ± 3	68 ± 2	75 ± 2	68 ± 3	42 ± 4	36 ± 5
Реакция на гипотонический шок, %	Глицерин	10 ± 2	13 ± 3	24 ± 3	30 ± 2	35 ± 3	30 ± 3	12 ± 3	0
	1,2 - ПД	7 ± 4	10 ± 4	21 ± 3	27 ± 3	30 ± 3	24 ± 4	9 ± 4	0

Таблица 4

Показатели	Криопротектор	Скорость охлаждения 2 этапа, °/мин							
		0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	2,0
АДФ-агрегация, %	Глицерин	15 ± 3	18 ± 3	28 ± 3	30 ± 3	27 ± 3	20 ± 2	12 ± 3	10 ± 3
	1,2 - ПД	13 ± 4	20 ± 3	27 ± 3	25 ± 2	25 ± 2	17 ± 3	14 ± 3	12 ± 3
Количество сохранившихся клеток, %	Глицерин	73 ± 4	76 ± 3	75 ± 3	77 ± 2	80 ± 3	75 ± 3	70 ± 3	73 ± 3
	1,2 - ПД	75 ± 3	88 ± 2	36 ± 2	87 ± 2	85 ± 3	84 ± 2	61 ± 2	78 ± 3
Ретракция, %	Глицерин	65 ± 4	68 ± 3	76 ± 2	74 ± 2	77 ± 3	65 ± 3	57 ± 3	55 ± 3
	1,2 - ПД	57 ± 3	64 ± 2	73 ± 2	75 ± 2	73 ± 2	61 ± 4	53 ± 3	48 ± 4
Реакция на гипотонический шок, %	Глицерин	19 ± 4	27 ± 3	34 ± 3	35 ± 3	36 ± 2	25 ± 3	15 ± 4	17 ± 3
	1,2 - ПД	16 ± 3	24 ± 3	32 ± 3	30 ± 3	33 ± 3	22 ± 3	13 ± 4	14 ± 3

Таблица 5

Показатели	Криопротектор	Скорость охлаждения 2 этапа, °C									
		-2,5	-4,0	-5,0	-6,0	-7,0	-8,0	-10,0	-12,0		
АДФ-агрегация, %	Глицерин	8 ± 3	17 ± 3	23 ± 2	30 ± 3	28 ± 3	22 ± 3	14 ± 3	12 ± 3		
	1,2 - ПД	10 ± 3	15 ± 2	21 ± 2	25 ± 2	26 ± 2	20 ± 2	12 ± 3	14 ± 3		
Количество сохранившихся клеток, %	Глицерин	64 ± 2	70 ± 2	75 ± 2	77 ± 2	79 ± 2	76 ± 2	73 ± 3	72 ± 3		
	1,2 - ПД	81 ± 2	84 ± 2	86 ± 2	87 ± 2	85 ± 2	85 ± 2	82 ± 3	83 ± 3		
Ретракция, %	Глицерин	42 ± 3	61 ± 2	68 ± 2	74 ± 2	73 ± 3	69 ± 2	58 ± 2	51 ± 3		
	1,2 - ПД	40 ± 3	58 ± 2	65 ± 2	75 ± 2	73 ± 2	66 ± 2	60 ± 2	53 ± 3		
Реакция на гипотонический шок, %	Глицерин	11 ± 3	20 ± 2	25 ± 2	35 ± 3	33 ± 2	27 ± 2	18 ± 3	13 ± 3		
	1,2 - ПД	12 ± 3	18 ± 2	24 ± 2	30 ± 3	29 ± 3	22 ± 3	15 ± 3	14 ± 3		

Таблица 6

Показатели	Криопротектор	Скорость охлаждения 3 этапа, °/мин									
		1	2	4	5	7	10	12	20		
АДФ-агрегация, %	Глицерин 1,2 – ПД	14 ± 3 17 ± 2	18 ± 3 17 ± 2	26 ± 2 19 ± 2	31 ± 2 25 ± 2	33 ± 3 24 ± 2	30 ± 3 25 ± 2	24 ± 3 13 ± 3	14 ± 4 13 ± 3		
Количество сохранившихся клеток, %	Глицерин 1,2 – ПД	70 ± 3 80 ± 2	73 ± 3 77 ± 3	75 ± 2 86 ± 3	76 ± 2 85 ± 2	75 ± 2 90 ± 2	77 ± 2 87 ± 2	72 ± 3 85 ± 2	67 ± 3 76 ± 3		
Ретракция, %	Глицерин 1,2 – ПД	55 ± 3 49 ± 2	57 ± 3 52 ± 3	68 ± 2 65 ± 3	76 ± 3 73 ± 2	72 ± 2 78 ± 2	74 ± 2 75 ± 2	64 ± 3 61 ± 3	51 ± 3 44 ± 3		
Реакция на гипотонический шок, %	Глицерин 1,2 – ПД	16 ± 3 17 ± 2	17 ± 4 15 ± 3	29 ± 2 21 ± 3	35 ± 3 28 ± 3	34 ± 3 30 ± 3	35 ± 3 30 ± 3	26 ± 3 22 ± 3	12 ± 3 15 ± 4		

Таблица 7

Показатели	Криопротектор	Конечная температура 3 этапа, °C				
		-60	-70	-80	-130	-196
АДФ-агрегация, %	Глицерин 1,2 – ПД	17 ± 3 13 ± 3	25 ± 3 18 ± 3	33 ± 3 25 ± 2	33 ± 3 24 ± 2	32 ± 3 25 ± 2
Количество сохранившихся клеток, %	Глицерин 1,2 – ПД	71 ± 3 79 ± 2	75 ± 2 82 ± 2	76 ± 2 86 ± 2	75 ± 2 90 ± 2	75 ± 2 88 ± 2
Ретракция, %	Глицерин 1,2 – ПД	53 ± 3 47 ± 3	67 ± 2 65 ± 3	75 ± 2 74 ± 2	72 ± 2 78 ± 2	74 ± 2 76 ± 2
Реакция на гипотонический шок, %	Глицерин 1,2 – ПД	18 ± 3 16 ± 2	27 ± 3 21 ± 3	36 ± 3 29 ± 3	34 ± 3 30 ± 3	35 ± 2 30 ± 3

Таблица 8

Способ консервирования	Криопротектор	Функциональные свойства деконсервированных тромбоцитов, $M \pm \sigma$			
		АДФ-агрегация, %	Количество сохранившихся клеток, %	Ретракция, %	Реакция на гипотонический шок, %
Прототип	Глицерин	$10,5 \pm 4,3$ $\sigma = 11,4$ $n = 7$	$71,4 \pm 4,3$ $\sigma = 11,4$ $n = 7$	$47,6 \pm 5,2$ $\sigma = 15,6$ $n = 9$	$18,0 \pm 4,6$ $\sigma = 14,7$ $n = 10$
Предлагаемый	Глицерин	$28,0 \pm 3,1$ $\sigma = 10,7$ $n = 12$	$79,0 \pm 2,1$ $\sigma = 7,3$ $n = 12$	$74,0 \pm 2,0$ $\sigma = 5,3$ $n = 12$	$35,0 \pm 3,2$ $\sigma = 11,0$ $n = 12$
	1,2 – ПД	$25,0 \pm 2,0$ $\sigma = 6,9$ $n = 12$	$87 \pm 2,3$ $\sigma = 8,0$ $n = 12$	$73,0 \pm 2,1$ $\sigma = 5,5$ $n = 12$	$30,0 \pm 3,1$ $\sigma = 10,7$ $n = 12$