

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

Наиболее близким к заявляемому является способ консервирования эритроцитов с использованием криопротектора 1,2-пропандиола (1,2ПД). Согласно этому способу эритроциты смешивают 1 : 1 с криоконсервантом, содержащим 35% 1,2ПД, 3% сахарозы, 0,6% хлорида натрия и воду бидистиллированную. Замораживают со скоростью 12 - 14°/мин до (-150) - (-170)°С, после чего погружают в жидкий азот.

Недостатком этого способа является то, что эритроциты можно сохранять для переливания в ресуспендирующей среде не более 24 часов.

В основу изобретения поставлена задача создания такого способа консервирования эритроцитов, в котором за счет изменения концентрации криопротектора и соотношения добавления его к эритроцитам можно было бы снизить осмотическое давление, оказываемое окружающей средой на клетку на этапах замораживания – отогрева, и тем самым увеличить срок их хранения до 4 - 6 суток.

Поставленная задача решается тем, что в способе криоконсервирования эритроцитов, включающем добавление к эритроцитам криоконсерванта, содержащего 1,2ПД, сахарозу, хлорид натрия и воду бидистиллированную, и замораживание со скоростью 12 - 14°/мин до (-150) - (-170)°С с последующим погружением в жидкий азот, используют криоконсервант с содержанием 1,2-пропандиола 45 - 75мас.%, а криоконсервант добавляют в соотношении эритроциты : криоконсервант 1 : (0,3 - 0,7) до конечной концентрации 1,2ПД в суспензии 25 - 29%.

Заявляемый способ осуществляют следующим образом.

Эритроциты центрифугируют при 2000об/мин в течение 20 - 25мин, удаляют надосадок и к эритроцитам в соотношении 1 : (0,3 - 0,7) добавляют криоконсервант, содержащий:

1,2ПД	45 - 75%
Сахароза	2 - 5%
NaCl	0,3 - 0,9%
Вода бидистиллированная	Остальное

Суспензию замораживают со скоростью 12 - 14°/мин до (-150) - (-170)°С, после чего переносят в жидкий азот. Отогревают сначала со скоростью 10°/мин до (-100) - (-120)°С, затем переносят в водяную баню (41 - 45)°С и отогревают до комнатной температуры. После отмывки переносят в раствор 8^в, где хранят в течение 4 - 6 суток.

Пример 1. Эритроциты человека центрифугировали при 2000об/мин в течение 20мин и удаляли надосадок. К эритроцитам добавляли растворы криоконсервантов до различных конечных концентраций 1,2ПД. Содержание сахарозы в криоконсерванте - 4%, NaCl - 0,6%.

Суспензии замораживали со скоростью 12°/мин до -170°С и переносили в жидкий азот. Отогревали со скоростью 10°/мин до -110 ± 10°С, переносили в водяную баню (43 ± 2°С) и отогревали до комнатной температуры. После отогрева отмывали растворами №1 (10% сахарозы, 1,6% NaCl, остальное - вода бидистиллированная) и №2 (5% сахарозы, 0,9% NaCl, остальное - вода бидистиллированная). Отмытые эритроциты переводили в раствор 8^в (1 : 1). Конечную концентрацию 1,2ПД в надосадке определяли методом ЯМР, точность оценки ±1%. Сохранность эритроцитов определяли по гемолизу. Результаты представлены в табл.1 (n = 6).

Из табл.1 видно, что при конечной концентрации 1,2ПД в суспензии 25 - 29% гемолиз через 6 суток хранения в 1,5 - 2 раза меньше, чем в прототипе. Общие потери при этом не возрастают.

Пример 2. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что конечная концентрация 1,2ПД в суспензии была постоянной (26 ± 1%), а изменяли концентрацию 1,2ПД в криоконсерванте и количество добавляемого криоконсерванта на 100мл эритроцитной массы. Содержание сахарозы - 4%, NaCl - 0,6%. Результаты представлены в табл.2 (n = 6).

Из табл.2 видно, что на 4 - е сутки хранения сохранность клеток в 2 раза выше, чем в прототипе, при использовании 1,2ПД в концентрации 45 - 75% и добавлении криоконсерванта к эритроцитам в соотношении эритроциты : криоконсервант 1 : (0,3 - 0,7). При концентрации 1,2ПД выше 75% возрастают общие потери.

Таким образом, заявляемый способ обеспечивает сохранность эритроцитов в ресуспендирующей среде в течение 4 - 6 суток. В ряде случаев, в зависимости от донора, сроки хранения криоконсервированных эритроцитов после отмывки и ресуспендирования в растворе 8^в достигали 11 дней (гемолиз 0,8%).

Хранение при -80°С в течение 3 месяцев эритроцитов, консервированных заявляемым способом и способом по прототипу, показало, что в первом случае общие потери меньше (1,2 ± 1%), чем во втором (15,4 ± 1,3%), а после отогрева, отмывки и ресуспендирования в среде 8^в первые пригодны для переливания (гемолиз 0,9 ± 0,2%), вторые не пригодны (гемолиз 1,5 ± 0,2%).

Добавление криоконсерванта в соотношении 1 : (0,4 - 0,5) является наиболее оптимальным, т.к. такое количество легко отмерить по используемым сейчас в службе крови флаконам (50мл на эритроцитную массу из одного флакона объемом 250мл или 0,5 от объема эритроцитной массы), и при этом достигается концентрация 1,2ПД в надосадке 25 - 28%).

При одинаковых объемах используемого криоконсерванта заявляемый способ позволяет законсервировать в 2 - 2,5 раза больше эритроцитной массы, чем прототип.

За счет добавления меньших объемов криоконсерванта экономится 15 - 30% реактивов и в 2 - 2,5 раза снижаются затраты на приготовление, хранение и транспортировку криоконсерванта, заготовку посуды и ее стерилизацию.

Таблица 1

Конечная концентрация 1.2 ПД, %	23 (прототип)	25	29	32	35	38	40
1	2	3	4	5	6	7	8
Исходная концентрация 1.2 ПД, %	35	55	60	68	75	80	85
Гемолиз в 8 ^н , %	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1

Общие потери, %	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3	4.4 ± 0.4	5.9 ± 0.4	7.6 ± 0.4	9.6 ± 0.6
Гемолиз через 4 суток, %	1.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	–
Гемолиз через 6 суток, %	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	более 2	–

Таблица 2

Исходная концентрация 1.2 ПД, %	Количество добавляемого криоконсерванта, мл на 100 мм эритромаcсы	Общие потери, %	Гемолиз на 4 сутки, %
35	100 (прототип)	2.8 ± 0.4	1.3 ± 0.2
40	86	2.8 ± 0.4	1.0 ± 0.1
45	68	2.2 ± 0.4	0.7 ± 0.1
50	55	2.2 ± 0.4	0.6 ± 0.1
55	46	2.6 ± 0.5	0.8 ± 0.1
60	40	3.2 ± 0.5	0.7 ± 0.1
65	35	3.4 ± 0.5	0.6 ± 0.1
70	31	3.6 ± 0.5	0.7 ± 0.1
75	28	3.5 ± 0.5	0.7 ± 0.1
80	25	5.7 ± 0.6	0.8 ± 0.1
85	23	5.3 ± 0.4	0.7 ± 0.1
87	22	6.1 ± 0.4	0.8 ± 0.1