

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В СРЕДЕ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ И 1,2-ПРОПАНДИОЛОМ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом темы «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных веществ и криопротекторов», № гос. регистрации 0104U006437.

Вступление. При замораживании эритроцитов в среде с декстраном не отмечается значительного гемолиза эритроцитов, при этом клетки морфологически представлены в основном дискоцитами [16]. Такие морфологические показатели отмечаются для клеток, которые не отмывались от декстрана после замораживания. Эритроциты, замороженные в среде с декстраном (30%) или глицерином (35%) и отмывые от криоконсерванта изотоническим раствором NaCl (0,9%), представлены сфероцитами и являются осмотически хрупкими по сравнению с интактными клетками [16]. Использование глицерина в высокой концентрации требует его отмывания гипертоническими растворами с целью сохранения осмотических свойств эритроцитов [1].

В связи с описанными данными возникает задача разработки криоконсервантов, которые не только будут обеспечивать сохранение осмотических свойств эритроцитов при замораживании, но и упрощать их отмывание от криоконсерванта после размораживания с использованием только изотонического раствора NaCl.

Известно, что если среда, в которой находятся эритроциты, содержит не более 6% глицерина, то последующее перенесение клеток в изотонический раствор NaCl не вызывает нарушения осмотической устойчивости клеток [4]. Эти данные указывают на то, что криоконсервант должен содержать невысокую концентрацию проникающего криопротектора для того, чтобы при отмывании эритроцитов изотоническим раствором NaCl получить осмотически нормальные клетки. Для 1,2-пропандиола (1,2-ПД) такая концентрация может быть выше, так как его проницаемость для мембран эритроцитов на порядок выше, чем у глицерина [5].

Установлено, что сочетание в криоконсерванте декстрана или ПЭГ-1500 с ДМСО (15%) приводит к устранению так называемого эффекта «упаковки» [7] (эффект «упаковки» – проявление большей степени повреждения эритроцитов при замораживании-отогреве с высоким гематокритом по

сравнению с низким гематокритом). При быстром замораживании-отогреве эффект «упаковки» определяется приростом постгипертонического стресса на клетки при размораживании [14]. В связи с этим устранение эффекта «упаковки» является показателем ослабления действия постгипертонического стресса и, следовательно, размороженные эритроциты могут быть более осмотически устойчивыми при процедуре отмывания криоконсерванта, что позволит упростить способ их отмывания, исключая гипертонические растворы.

Степень постгипертонического повреждения эритроцитов существенно зависит от температуры ресуспендирующей среды, при температуре 35-37°C клетки проявляют наибольшую устойчивость к данному повреждающему фактору [18].

Следовательно, для отмывания эритроцитов после размораживания одним изотоническим раствором NaCl без использования гипертонических растворов, криоконсервант должен содержать невысокую концентрацию проникающего криопротектора. При этом отмывание необходимо производить при 35-37°C, для ослабления повреждающего действия постгипертонического стресса при размораживании.

В работе исследовали осмотические характеристики замороженных эритроцитов, такие как осмотическая хрупкость и барьерная функция мембран для анионов сульфата и глутатиона. Транспорт сульфата в эритроциты в сульфатной среде сопряжен с транспортом ионов H^+ [17]. Можно предположить, что в случае повреждения мембран анионы SO_4^{2-} и, соответственно, ионы H^+ будут проникать в эритроциты дополнительным неспецифическим путем. При этом вычисляемые скорости транспорта ионов могут превышать таковые показатели для интактных клеток. Поэтому исследование транспорта ионов H^+ и анионов SO_4^{2-} может являться подходом для оценки барьерной функции мембран эритроцитов при замораживании. При замораживании в мембранах эритроцитов образуются повреждения, которые при отмывании криоконсерванта образуют гемолитические поры проницаемые для гемоглобина с последующим гемолизом. Однако в оставшихся клетках указанные повреждения могут образовывать поры меньшего размера непроницаемые для гемоглобина (мол. масса 64500), но проницаемые

для молекул меньших размеров такие, как глутатион (мол. масса 307). Поэтому такие клетки утрачивают барьерную функцию мембран для глутатиона.

Цель работы – определить осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства эритроцитов, отмытых изотоническим раствором NaCl после замораживания в комбинированной среде с ПЭГ-1500 и 1,2-ПД.

Объект и методы исследования. В работе использовали NaCl («х. ч.»), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) производства Merck (Германия), 1,2-пропандиол (1,2-ПД) производства «Химпром» (Россия). Среда замораживания готовили на изотоническом растворе NaCl (0,9%). Криоконсерванты содержали ПЭГ-1500 (20%) или ПЭГ-1500 (20%) в комбинации с 1,2-ПД (15%). Конечная концентрация NaCl в среде замораживания составляла 0,63%.

Эритроциты человека получали из крови 2-й группы от доноров мужского пола после четырехкратного отмывания их изотоническим раствором NaCl. Металлические контейнеры объемом 1 мл с образцами эритроцитов в средах замораживания с гематокритом 40% инкубировали

30 мин при 25°C, затем погружали в жидкий азот (-196°C) на 30 мин. Замороженные образцы эритроцитов размораживали на водяной бане при 40°C в течение 3 мин. Затем к 1 мл размороженной клеточной суспензии при перемешивании медленно добавляли 9 мл теплого (37°C) изотонического раствора NaCl в течение не менее 30 секунд (скорость добавления – не более 0,3 мл/сек). Суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Процедуру разведения и центрифугирования повторяли еще один раз. После этого эритроциты дважды отмывали теплым (37°C) изотоническим раствором NaCl, при этом скорость разведения осадка эритроцитов не учитывали.

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 ммоль/л трис-буфера (pH 7,4) и NaCl с различной концентрацией (0,09-0,9%). Клетки в среде объемом 1 мл с гематокритом 0,6% инкубировали в течение 15 мин при 25°C, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин с последующим измерением степени гемолиза в надосадочной жидкости.

Степень гемолиза эритроцитов вычисляли после спектрофотометрического определения количества гемоглобина, измеряя поглощение в супернатанте образцов при длине волны 543 нм [15]:

$$\text{степень гемолиза (\%)} = [A_1/A_2] \cdot 100,$$

где A_1 – поглощение супернатанта экспериментального образца;

A_2 – поглощение при полном гемолизе контрольного образца.

Транспорт ионов H^+ в эритроцитах в сульфатной среде (0,11 моль/л Na_2SO_4) без буфера исследовали в термостатируемой ячейке (37°C) с pH электродом при постоянном перемешивании клеточной суспензии. [17]. При внесении эритроцитов

в изотонический раствор Na_2SO_4 , не содержащий буферных компонентов, происходит двухфазное изменение pH внешней среды – закисление с последующим защелачиванием. Такое изменение pH связано с обменом внутриклеточного Cl^- на внеклеточный SO_4^{2-} . При этом выход ионов H^+ из клетки определяется функционированием цикла Якобса-Стюарта, тогда как вход связан непосредственно с транспортом SO_4^{2-} в клетку [17].

Величину потока ионов H^+ вычисляли по формуле:

$$J = kx(V/A) \cdot \Delta H \text{ (моль} \cdot \text{хс} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{хс}^{-1}\text{)}.$$

где ΔH – изменение концентрации ионов H^+ во внешней среде в ходе обмена Cl^- на SO_4^{2-} ; k – константа скорости транспорта ионов H^+ (с^{-1}), которую вычисляли по методу [9]. V/A – отношение объема внутриклеточной воды к площади поверхности мембраны. В изотонических условиях для эритроцитов $V/A = 6,34 \cdot 10^{-5}$ см.

Содержание глутатиона в эритроцитах определяли спектрофотометрически с использованием дитиобиснитробензойной кислоты при длине волны 412 нм [12].

Определение малонового диальдегида (МДА) производили спектрофотометрически при длине волны 535 нм, используя тиобарбитуровую кислоту согласно методу [3].

Активность глутатионпероксидазы оценивали по методу [6] с использованием дитиобиснитробензойной кислоты, активность глутатионредуктазы – с применением метода [10].

Морфологию эритроцитов до и после замораживания изучали с помощью светового микроскопа. В суспензию эритроцитов с гематокритом 2% вносили альбумин в концентрации 1%, взвесь перемешивали и тестировали изменение морфологии. Альбумин является стабилизатором дискоидных форм эритроцитов (нормоцитов) в крови [13], поэтому по степени их трансформации в дискоциты можно судить об обратимости структурных нарушений в мембранах замороженных клеток.

Статистические расчеты производили на основе результатов, полученных на эритроцитах от семи доноров. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $p < 0,05$ [2].

Результаты исследований и их обсуждение.

На рис. 1 представлены результаты экспериментов, где показано, что для устранения так называемого эффекта «упаковки», т.е., устранение различия в степени гемолиза эритроцитов между образцами с низким (0,8%) и высоким (40%) гематокритом, (соответственно ослабления действия постгипертонического стресса на эритроциты при размораживании) требуется сочетание ПЭГ-1500 с 1,2-ПД в концентрации 15%.

Замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к значительной степени повреждения клеток (65%), а также к повышению потока

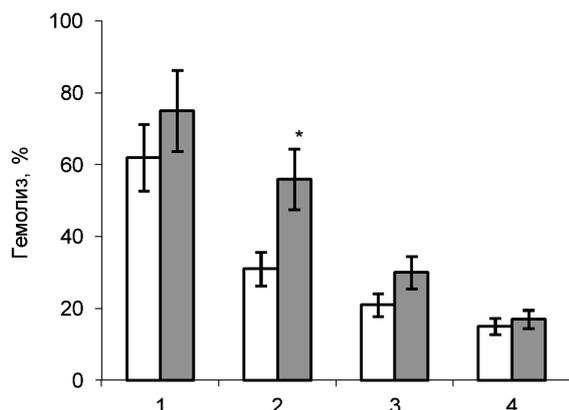


Рис. 1. Гемолиз эритроцитов в цикле быстрого замораживания-отогрева в средах с различным гематокритом (□ – 0,8%; ■ – 40%). 1,2,3,4 – 10% ПЭГ-1500+1,2-ПД в концентрации: 1 – 0%; 2 – 5%; 3 – 10%; 4 – 15%.

Примечание: * – статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями гемолиза при замораживании с гематокритом 0,8% ($p < 0,05$).

ионов H^+ (соответственно, анионов SO_4^{2-}) в негемолизированных эритроцитах в сульфатной среде по сравнению с интактными клетками (табл. 1).

Включение в среду замораживания 1,2-ПД приводит к значительному снижению степени повреждения эритроцитов, при этом показатели потока ионов H^+ незначительно превышают аналогичные величины для интактных клеток (табл. 1).

Результаты исследования осмотического гемолиза замороженных эритроцитов представлены на рис. 2. В солевой среде с концентрацией NaCl 0,45-0,9% отмечается снижение осмотической

устойчивости эритроцитов, замороженных в среде с ПЭГ-1500 (по сравнению с интактными клетками), тогда как при концентрации соли 0,09-0,4% выявляется повышение осмотической устойчивости (рис 2, кривая 3). При сочетании в среде замораживания ПЭГ-1500 и 1,2-ПД, кривая осмотического гемолиза замороженных эритроцитов несущественно отличается от таковой для интактных клеток, что указывает на сохранение осмотической хрупкости замороженных эритроцитов (рис 2, кривая 2).

Предполагается, что рост осмотической устойчивости эритроцитов в интервале показателей концентрации NaCl 0,09-0,4% связан с нарастанием

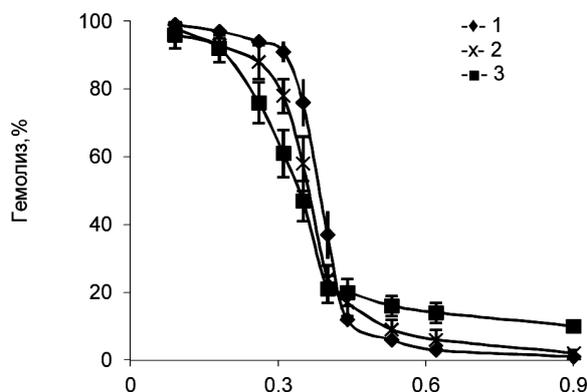


Рис. 2. Зависимость гемолиза от концентрации NaCl для эритроцитов, отмытых после замораживания (-196°С) в различных средах. 1 – интактные клетки; 2 – среда содержит 20% ПЭГ-1500 и 15% 1,2-ПД; 3 – среда содержит 20% ПЭГ-1500.

Таблица 1

Осмотические характеристики эритроцитов, отмытых после замораживания (-196°С)

Образцы клеток	Среды замораживания	Гемолиз, %	Поток ионов H^+ в оставшейся части эритроцитов в сульфатной среде ($JЧ10^6$), моль $Чсм^{-2}Чс^{-1}$	
			Из клетки	В клетку
Интактные	–	–	$1,31 \pm 0,17$	$0,94 \pm 0,14$
Замороженные	ПЭГ-1500 (20%)	$65,0 \pm 3,5$	$1,95 \pm 0,26^*$	$1,65 \pm 0,22^*$
	ПЭГ-1500 (20%)+ 1,2-ПД	$6,0 \pm 2,0$	$1,61 \pm 0,22$	$1,13 \pm 0,16$

Примечание: * – статистически достоверно по сравнению с интактными эритроцитами, ($p < 0,05$).

градиента концентрации ПЭГ-1500 на мембранах клеток при охлаждении [8].

Антиоксидантные характеристики замороженных эритроцитов представлены в табл. 2. Не отмечается значительного роста МДА в эритроцитах, замороженных в среде с ПЭГ-1500 или в среде с ПЭГ-1500 и 1,2-ПД (табл. 2). В эритроцитах после замораживания в среде, содержащей ПЭГ-1500, после отмытия криоконсерванта отмечается значительное уменьшение концентрации глутатиона. Вместе с тем, включение в среду замораживания дополнительно 1,2-ПД не приводит к значительному уменьшению глутатиона в эритроцитах после отмытия криоконсерванта (табл. 2). Это указывает на сохранение барьерной функции мембран для глутатиона при замораживании эритроцитов в комбинированном криоконсерванте с ПЭГ-1500 и 1,2-ПД.

Активность глутатионзависимых ферментов после замораживания эритроцитов существенно не изменялась (табл. 2).

На рис. 3 представлены микрофотографии эритроцитов, отмытых изотоническим раствором NaCl. Интактные клетки представлены стоматоцитами (70-80%) и эхиноцитами (20-30%, фото 1), а в присутствии альбумина эритроциты преобразуются в

Антиоксидантные характеристики замороженных эритроцитов

Образцы клеток	Среды замораживания	МДА, мкмоль/г Hb	Глутатион, мкмоль/г Hb	Глутатион-пероксидаза, мкмоль глутатиона/ч (минЧг Hb) ⁻¹	Глутатион-редуктаза, мкмоль НАДФН ₂ /ч (минЧг Hb) ⁻¹
Интактные	—	0,98±0,15	9,5±1,5	136,5±20,4	12,5±1,9
Замороженные	ПЭГ-1500	1,07±1,7	¹ 9,2±1,4 ² 4,0±0,6*	128,0±21,0	10,5±1,5
	ПЭГ-1500 +1,2-ПД	1,12±1,6	¹ 9,0±1,7 ² 8,2±1,3	125,5±20,0	11,7±1,8

Примечание: ¹ – до отмыывания, ² – после отмыывания. * – статистически достоверно по сравнению с неотмытыми эритроцитами (p < 0,05).

дискоциты (нормоциты) (**фото 2**). Эритроциты, отмытые после замораживания с ПЭГ-1500, являются сфероцитами (**фото 3**), присутствие альбумина в среде приводит к изменению формы клеток и они становятся эхиоцитами (**фото 4**). После замораживания в комбинированном криоконсерванте, содержащем ПЭГ-1500 и 1,2-ПД, эритроциты представлены эхиоцитами и сферозхиоцитами (**фото 5**), вместе с тем присутствие в среде альбумина приводит к изменению формы клеток, и они становятся в основном дискоцитами (65-75%) с меньшим количеством содержания стоматоцитов (7-15%) и эхиоцитов (10-15%) (**фото 6**). Вероятно, эритроциты,

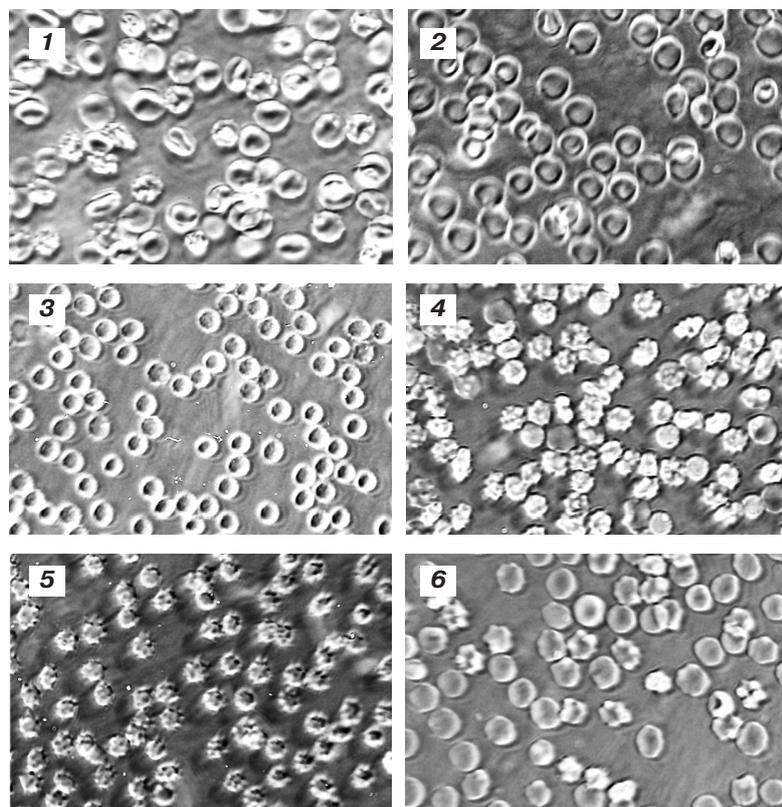


Рис. 3. Морфология эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl: 1,3,5 – без альбумина; 2,4,6 – при наличии альбумина (1%). 1,2 – интактные клетки; 3,4 – после замораживания (-196°С) в среде, содержащей ПЭГ-1500; 5,6 – после замораживания (-196°С) в среде, содержащей ПЭГ-1500 и 1,2-ПД.

замороженные в комбинированном криоконсерванте, смогут восстанавливать свою функциональную полноценность после попадания в кровяное русло.

Следовательно, замораживание эритроцитов в среде, содержащей ПЭГ-1500, приводит к значительной степени повреждения эритроцитов и ухудшению осмотических и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмыывания криоконсерванта, однако не выявляется существенного накопления МДА в мембранах и изменения активности глутатионзависимых ферментов. Включение в состав среды проникающего криопротектора 1,2-ПД в концентрации 15% обеспечивает ослабление действия постгипертонического стресса при размораживании, невысокую степень повреждения эритроцитов и сохранение осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмыывания криоконсерванта.

Полимерные криопротекторы, такие как ПЭГ-1500, концентрируясь в ходе замораживания, вносят значительный вклад в нарастание гипертонического градиента и стресса на клеточных мембранах [11]. Криозащитное действие проникающих криопротекторов связано с замедлением гиперконцентрирования внешней среды и уменьшением степени дегидратации клеток. Вместе с тем уменьшение степени дегидратации приводит к возрастанию вероятности формирования внутриклеточных кристаллов льда [11]. Следовательно, как у непроникающих так и у проникающих криопротекторов существуют сопутствующие отрицательные свойства в цикле замораживания-отогрева клеточных суспензий которые, исходя из вышеизложенного, можно ослабить, комбинируя в среде замораживания два вида криопротектора. Включение проникающего криопротектора в среду с непроникающим криопротектором и поступление его в клетки может привести к уменьшению степени их дегидратации и, соответственно, к ослаблению гипертонического стресса в ходе замораживания, обусловленного концентрированием непроникающего криопротектора. Уменьшение интенсивности гипертонического стресса создает условия для ослабления влияния осмотического воздействия при

размораживании, которое связано с постгипертоническим стрессом на конечном этапе быстрого отогрева [14]. Приведенные данные указывают на вероятный механизм эффективности комбинированных криоконсервантов, содержащих непроникающие и проникающие криопротекторы, связанный с ослаблением действия гипертонического стресса на клетки при охлаждении и постгипертонического стресса при их отогреве.

Таким образом, замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к значительной степени повреждения клеток и существенному изменению осмотических и морфологических свойств оставшейся части эритроцитов после отмывания криоконсерванта. В то же время, не выявлено значительного изменения концентрации МДА и активности глутатионзависимых ферментов в эритроцитах после замораживания. Сочетание в криоконсерванте ПЭГ-1500 и 1,2-ПД обеспечивает эффективное криозащитное свойство комбинированного состава, которое противодействует повреждающим факторам при замораживании-отогреве и обеспечивает упрощение отмывания эритроцитов после размораживания, позволяя их отмывать изотоническим раствором NaCl без использования гипертонических сред. При этом эритроциты сохраняют осмотические, антиоксидантные и морфологические показатели. На основе полученных результатов можно предположить,

что криозащитная эффективность использованного комбинированного состава (ПЭГ-1500+1,2-ПД) связана с поступлением в клетки 1,2-ПД и, вследствие этого, ослаблением гипертонического стресса, который обусловлен концентрированием непроникающих компонентов среды при замораживании, что обеспечивает сохранение устойчивости клеток к постгипертоническому стрессу при размораживании.

Выводы.

1. Замораживание эритроцитов в среде, содержащей ПЭГ-1500 (20%) приводит к значительной степени их повреждения и потере барьерной функции мембран для сульфата и глутатиона в оставшейся части клеток. При этом эритроциты являются осмотически хрупкими и представлены сфероцитами.

2. Замораживание эритроцитов в среде, содержащей ПЭГ-1500 (20%) и 1,2-ПД (15%) обеспечивает ослабление действия постгипертонического стресса при размораживании, невысокую степень повреждения и сохранение удовлетворительных осмотических, антиоксидантных и морфологических показателей оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта.

Перспективы дальнейших исследований. В следующей работе планируется исследовать осмотические и морфологические свойства эритроцитов при замораживании в среде, содержащей ПЭГ-1500 и глицерин.

Литература

1. Аграненко В. А. Замороженная кровь и ее клиническое применение / В. А. Аграненко, Л. И. Федорова. – М.: Медицина, 1983. – 96 с.
2. Ашмарин И. П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И. П. Ашмарин, И. П. Васильев, В. А. Амбросов. – Л.: Из-во Ленингр. Ун-та. 1975. – 76 с.
3. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М.: Наука. 1972. – 270 с.
4. Михнович Е. П. Криоконсервация эритроцитов при -196°C с проникающими и непроникающими веществами / Е. П. Михнович, М. А. Рождественская, Г. Т. Недельский // «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». – Киев : Наук. Думка. 1974. – С. 161–164.
5. Паніна Ю. Є. Фізико-математична теорія гіпотонічного гемолізу еритроцитів людини : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фіз.-мат. наук : спец. 03. 00. 19 «Криобіологія» / Ю. Є. Паніна. – Харків, 1999. – 17 с.
6. Разыграев А. В. Определение глутатион-пероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дифенил-2-нитробензойной кислоты / А. В. Разыграев, А. В. Арутюнян // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 6. – С. 13–16.
7. Рамазанов В. В. Проявление и устранение эффекта «упаковки» в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами / В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 3 – С. 312–323.
8. Рамазанов В. В. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами / В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 1 – С. 47–58.
9. Рамазанов В. В. Функционирование системы транспорта ионов H^+ при модификации мембран эритроцитов в условиях, моделирующих условия замораживания / В. В. Рамазанов, Р. Ф. Забродский, Я. Ю. Найдюк, В. А. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 3 – С. 186–192.
10. Юсупова Л. Б. О повышении точности определения активности глутатион-редуктазы эритроцитов / Л. Б. Юсупова // Лабораторное дело. – 1989. – № 4. – С. 19–21.
11. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues / J. Bakhach // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 119–126.
12. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods / E. . Beutler – New York : Grune&Stratton, 1975. – 160 p.
13. Hoffman J. F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells / J. F. Hoffman // Blood Cells. – 1987. – Vol. 12, № 3. – P. 565–588.
14. Levin R. L. The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing / R. L. Levin // Cryobiology. – 1982. – Vol. 19, № 6. – P. 669.
15. Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose / P. Mazur, R. H. Miller // Cryobiology. – 1976. – Vol. 13, № 5. – P. 523–536.

16. Pellerin-Mendes C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier // *Cryobiology*. – 1997. – Vol. 35, № 2. – P. 173–186.
17. Romano L. Characterization of anion transport system in trout red blood cell / L. Romano, H. Passow // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 246. – P. 330–338.
18. Woolgar A. E. Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on post-hypertonic haemolysis of human red blood cells / A. E. Woolgar, C. J. Morris // *Cryobiology*. – 1973. – Vol. 10. – P. 82–86.

УДК 577.352.4:612.111:547.42

ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ, ЯКІ ЗАМОРОЖУВАЛИ У КОМБІНОВАНОМУ СЕРЕДОВИЩІ ІЗ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЕМ ТА 1,2-ПРОПАНДІОЛОМ

Рамазанов В. В., Воловельська Є. Л., Коптелов В. О., Бондаренко В. А.

Резюме. У роботі досліджували осмотичні, антиоксидантні та морфологічні характеристики еритроцитів, які заморожували у рідкому азоті (-196°C) у середовищі, що містить ПЕГ-1500 або у комбінованому середовищі із ПЕГ-1500 та 1,2-пропандіолом (1,2-ПД). При заморожуванні у середовищі, що містить ПЕГ-1500, визначається значна ступень пошкодження еритроцитів (65%) і втрата бар'єрної функції мембран для сульфату та глутатіону у залишковій частині клітин після відмивання криоконсерванту. У той же час, не визначено суттєвого зростання концентрації малонового діальдегіду та значної зміни показників активності глутатіонзалежних ферментів (глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази) при заморожуванні у двох вищевказаних середовищах. При додатковому включенні у захисне середовище 1,2-ПД ступінь пошкодження еритроцитів при заморожуванні значно знижується (6%) з утриманням осмотичних, антиоксидантних та морфологічних властивостей залишкової частини клітин після відмивання криоконсерванту.

Отримані результати дозволяють припустити, що збереження осмотичних та морфологічних властивостей еритроцитів, які заморожували у комбінованому середовищі із ПЕГ-1500 та 1,2-ПД, забезпечується проникністю останнього у клітини і послабленням гіпертонічного стресу, який обумовлений концентруванням ПЕГ-1500 при заморожуванні, що забезпечує збереження стійкості еритроцитів до постгіпертонічного стресу при розморожуванні.

Ключові слова: еритроцити, осмотичні, антиоксидантні та морфологічні властивості, заморожування, комбінований криоконсервант.

УДК 577.352.4:612.111:547.42

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В СРЕДЕ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ И 1,2-ПРОПАНДИОЛОМ

Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Коптелов В. А., Бондаренко В. А.

Резюме. В работе исследовали осмотические, антиоксидантные и морфологические характеристики эритроцитов, которые замораживали в жидком азоте (-196°C) в среде, которая содержит ПЭГ-1500, или в комбинированной среде из ПЭГ-1500 и 1,2-пропандиола (1,2-ПД). При замораживании в среде, которая содержит ПЭГ-1500, определяется значительная степень повреждения эритроцитов (65%) и потеря барьерной функции мембран для сульфата и глутатиона в остаточной части клеток после отмывания криоконсерванта. В то же время, не выявлено существенного роста концентрации малонового диальдегида и значительного изменения показателей активности глутатионзависимых ферментов (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы) при замораживании в двух вышеуказанных средах. При дополнительном включении в защитную среду 1,2-ПД, степень повреждения эритроцитов при замораживании значительно снижается (6%) с содержанием осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств остаточной части клеток после отмывания криоконсерванта.

Полученные результаты позволяют допустить, что сохранение осмотических и морфологических свойств эритроцитов, которые замораживали в комбинированной среде из ПЭГ-1500 и 1,2-ПД, обеспечивается проникаемостью последней в клетки и послаблением гипертонического стресса, который обусловлен концентрированием ПЭГ-1500 при замораживании, которое обеспечивает сохранение стойкости эритроцитов к постгипертоническому стрессу при размораживании.

Ключевые слова: эритроциты, осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства, замораживание, комбинированный криоконсервант.

UDC 577.352.4:612.111:547.42

Properties of Erythrocytes Frozen in Combined Medium with Polyethylenglycol and 1,2-Propanediol

Ramazanov V. V., Volovelskaya E. L., Koptelov V. A., Bondarenko V. A.

Abstract. During freezing of cell suspensions the components of cryopreservative are exposed to concentrating and have both protective and damaging effect on cells. Cryoprotective effect of polymeric non-penetrating cryoprotectants is associated with their capability to structure water and maintains it in liquid state at low temperatures during freezing (down to -35°C), providing preservation of reparative properties of membranes. Herewith frozen-thawed cells do not lose the capacity to recover its cation balance. Along with the positive

effects polymers concentrating during freezing contribute to a significant dehydration of cells and damage of cell membranes. Therefore the problem of approach search of weakening a negative property of polymers during freezing arises. Cryoprotective effect of penetrating cryoprotectants is associated with their penetration into cells and reduction of their dehydration rate, weakening of intensity of environmental hyperconcentrating as well. Moreover reduction of cell dehydration rate may result in probability increase of formation of intracellular ice crystals. Probably negative property of polymeric (non-penetrating) cryoprotectant during freezing of cell suspensions is possible to weaken during introduction of penetrating cryoprotectant into cryopreservative. Inflow of the last into cells may result in reduction of their dehydration rate and, accordingly, weakening of hypertonic stress during freezing, stipulated by concentrating of non-penetrating cryoprotectant. The decrease in intensity of hypertonic stress may weaken the effect of post-hypertonic stress on cells during freeze-thawing and provide preservation of structural and functional properties of cell membranes. Recently there has been used a combined cryopreservative, containing hydroxyethylated starch and dimethyl sulfoxide being effective during freezing of different cells. In addition the mechanisms of protective efficiency of cryopreservatives, including non-penetrating and penetrating cryoprotectants are not revealed.

Osmotic, antioxidative and morphological characteristics of erythrocytes frozen in liquid nitrogen (-196°C) in the medium containing PEG-1500 or in combined medium with PEG-1500 and 1,2-PD were studied. During freezing in PEG-1500 containing medium significant rate of erythrocytes damage (65%), loss by glutathione cells during cryopreservative washing-out and penetration increase of the rest of cells for H^+ ions, morphologically presented by spherocytes were noted.

At the same time no significant increase of malondialdehyde concentration and valuable change of indices of glutathione-dependent enzymes activity (glutathione reductase and glutathione peroxidase) during freezing in two presented media was found-out. During additional introduction 1,2-PD into medium the damage rate of erythrocytes during freezing significantly decreases (6%) with keeping the sufficient osmotic, antioxidative and morphological properties of the remained part of cells after cryopreservative washing-out.

The findings enable the suggestion of keeping the osmotic and morphological properties of erythrocytes, frozen in combined medium with PEG-1500 and 1,2-PD, provided by penetration of the latter into the cells and weakening of hypertonic stress, stipulated by NaCl and PEG-1500 concentrating during freezing, which provides maintenance of erythrocyte resistance to posthypertonic stress during thawing.

Key words: erythrocytes, osmotic, antioxidative and morphological properties, freezing, combined cryopreservative.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.

Стаття надійшла 23. 05. 2014 р.