

Влияние непроникающих криопротекторов и скорости охлаждения на гипертонический криогемолиз эритроцитов человека

Н.А. ПИСАРЕНКО², В.В. РАМАЗАНОВ¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Influence of Non-Penetrative Cryoprotectants and Cooling Rate on Hypertonic Cryohemolysis of Human Erythrocytes

N.A. PISARENKO², V.V. RAMAZANOV¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

²V.N. Karazin National University, Kharkov

Гипертонический криогемолиз (ГК) – повреждение эритроцитов человека, обусловленное экспозицией клеток в гипертоническом растворе солей или неэлектролитов в диапазоне от 45 до 20°C и последующим охлаждением до температур, близких к 0°C. В настоящее время определены факторы, вызывающие сенсбилизацию клеток к ГК, однако влияние криопротекторов на динамику развития этого процесса не изучено.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека II группы. ГК осуществляли посредством переноса аликвот клеточной суспензии эритроцитов из проб, подвергнутых инкубации при 37°C в среде 1,2M NaCl, 10mM трисбуфера, pH 7,6 в течение 1-60 мин (первая стадия), в 1 мл раствора дегидратации при температуре 37 или 0°C на 10 мин (вторая стадия). Криопротекторы (полиэтиленгликоль 2000 и декстран 20000) в концентрации 20% добавляли в исследуемый раствор на этапах дегидратации, охлаждения либо на обоих этапах ГК.

Проведенные исследования показали, что полиэтиленгликоль (ПЭГ) снижает чувствительность эритроцитов человека к ГК как при медленном, так и при быстром охлаждении, причем его действие более выражено в условиях последнего. При медленном охлаждении присутствие ПЭГ на стадии дегидратации приводит практически к 100%-му лизису эритроцитов, однако с увеличением продолжительности инкубации наблюдается резкое снижение процента лизиса клеток. В случае быстрого охлаждения удаление ПЭГ перед второй стадией приводит к резкому возрастанию чувствительности клеток к ГК. При быстром охлаждении присутствие ПЭГ на второй стадии ГК проявляется в выраженном его криозащитном действии. Декстран снижает чувствительность эритроцитов человека к ГК и проявляет более эффективные защитные свойства при медленном охлаждении. При быстром охлаждении присутствие декстрана на первой стадии приводит к более резкому увеличению чувствительности эритроцитов к ГК, чем при медленном. На стадии охлаждения он вызывает снижение чувствительности эритроцитов к ГК по сравнению с его присутствием на обоих стадиях. Максимальное криозащитное действие данного криопротектора наблюдается при медленном охлаждении (не более 3 % лизиса).

Таким образом, защитное действие ПЭГ выявляется при быстром охлаждении, когда он присутствует на второй стадии ГК. Декстран проявляет криопротекторные свойства более эффективно в условиях медленного охлаждения, при этом максимальное криозащитное действие наблюдается в его присутствии на стадии охлаждения. Удаление ПЭГ перед охлаждением вызывает более значительное снижение чувствительности эритроцитов к ГК по сравнению с удалением декстрана, на основании этого можно предположить, что десорбция от мембраны ПЭГ вызывает большее повреждение, чем десорбция декстрана.

Hypertonic cryohemolysis (HC) is human erythrocytes damage, stipulated by cell exposure to either hypertonic solution of salts or non-electrolytes within the range from 45 to 20°C and following cooling down to the temperatures close to 0°C. Nowadays the factors, causing cell sensibilization to HC are determined, but the effect of cryoprotectants on the dynamics of this process development has not been studied yet.

Erythrocytes of A(II) human donor blood served as investigation object. HC was realised via transferring erythrocyte cell suspension aliquots from the samples, subjected to incubation at 37°C in 1.2M NaCl, 10mM tris buffer medium, pH 7.6 within 1-60 min (the first stage) into a 1 ml dehydration solution at 37 or 0°C for 10 min (the second stage). Cryoprotectants (polyethylene 2000 and dextran 20000) in 20% concentration were added into the studied solution at the stages of dehydration, cooling or at both HC stages.

The performed research demonstrated polyethylene glycol (PEG) as reducing human erythrocyte sensitivity to HC both under slow and rapid cooling, moreover under the latter its effect was more manifested. Under slow cooling down the PEG presence at dehydration stage results in almost 100% erythrocyte lysis, but with an increase in incubation duration a sharp decrease in percentage of cell lysis is noted. In case of rapid cooling the PEG removal before the second stage results in a sharp increase in cell sensitivity to HC. Under rapid cooling the PEG presence at the second HC stage manifests in expressed cryoprotective effect. Dextran reduces human erythrocyte sensitivity to HC and manifests more efficient protective properties under slow cooling. Under rapid cooling the dextran presence at the first stage results in sharper augmentation of erythrocyte sensitivity to HC than under slow one. At cooling stage it reduces erythrocyte sensitivity to HC in comparison with its presence at both stages. Maximum cryoprotective effect of this cryoprotectant is observed under slow cooling (not more than 3% lysis).

Thus, PEG cryoprotective effect is revealed under rapid cooling, when it is present at the second HC stage. Dextran cryoprotective properties are more efficient under slow cooling conditions, at the same time the maximum cryoprotective effect is observed at its presence at cooling stage. PEG removal prior to cooling reduces more significantly erythrocyte sensitivity to HC in comparison with dextran removal. Due to this, PEG desorption from a membrane may be assumed as causing higher damage than dextran one.