

УДК 57.043:547.42

В.В.РАМАЗАНОВ*, В.А.БОНДАРЕНКО

Криопротекция полиэтиленгликолями и декстранами при замораживании эритроцитов с низким гематокритом

UDC 57.043:547.42

V.V. RAMAZANOV*, V.A. BONDARENKO

Cryoprotection with Polyethylene Glycols and Dextrans During Freezing of Erythrocytes with Low Hematocrit

Исследовали влияние различных концентраций полимеров на сохранность эритроцитов, замороженных с низким гематокритом (0,8%). Отмечено существенное снижение криопротекторной эффективности и выявлено повреждающее действие ПЭГ-1500 в концентрации 20% в условиях снижения ионной силы и повышения концентрации сахарозы. Повышение гематокрита в среде замораживания до 40% устраняет данный эффект. Присутствие в криоконсерванте проникающих криопротекторов приводит к менее выраженной зависимости криопротекции с ПЭГ-1500 от ионной силы. Эксперименты при замещении катиона Na^+ на катион NH_4^+ при использовании сахарозо-солевой среды с высокой концентрацией сахарозы позволяют предположить, что баланс криопротекторного и повреждающего действия полимеров определяется их молекулярной массой и зависит от интенсивности нарастания осмотического градиента на мембране клеток при замораживании.

Ключевые слова: гематокрит, полиэтиленгликоли, декстраны, эритроциты, криоконсервирование.

Досліджували вплив різних концентрацій полімерів на збереженість еритроцитів, заморожених з низьким гематокритом (0,8%). Показано істотне зниження криопротекторної ефективності та виявлено ушкоджуючу дію ПЕГ-1500 у концентрації 20% в умовах зниження іонної сили й підвищення концентрації сахарози. Підвищення гематокриту в середовищі заморожування до 40% усуває даний ефект. Присутність у криоконсерванті проникаючих криопротекторів призводить до менш вираженої залежності криопротекції з ПЕГ-1500 від іонної сили. Експерименти при заміщенні катіона Na^+ на катіон NH_4^+ при використанні сахарозо-сольового середовища з високою концентрацією сахарози дозволяють допустити, що баланс криопротекторної та ушкоджуючої дії визначається молекулярною масою полімера та залежить від інтенсивності наростання осмотичного градієнта на мембрані клітин при заморожуванні.

Ключові слова: гематокрит, поліетиленгліколи, декстрани, еритроцити, криоконсервування.

The effect of different concentrations of polymers on the survival of the erythrocytes frozen with low hematocrit (0.8%) was investigated. A significant reduction of cryoprotective activity was noted, as well as damaging effect of PEG-1500 under 20% concentration under conditions of ionic strength and increased sucrose concentration was revealed. A rise in hematocrit in the freezing medium up to 40% eliminates this effect. The presence of penetrating cryoprotectants in cryopreservative results is less manifested dependence of cryoprotection with PEG-1500 on ionic strength. The experiments on substitution of Na^+ cation to NH_4^+ one when using sucrose-salt medium with high concentration of sucrose enable the supposing that the balance of cryoprotective and damaging effect of polymers is determined by their molecular mass and depends on the intensity of augmentation of osmotic gradient on cell membrane during freezing.

Key-words: hematocrit, polyethylene glycols, dextrans, erythrocytes, cryopreservation.

Замораживание эритроцитов в средах с непроникающими криопротекторами обычно приводит к значительной осмотической неустойчивости клеток и к изменению количественного состава белков цитоскелета [1, 28, 31], тогда как сочетание с полимерами проникающих криопротекторов обеспечивает лучшие количественные и качественные показатели для многих клеток после их замораживания, включая стволовые клетки периферической крови [19, 29], нефракционированные клетки костного

Freezing of erythrocytes in the media with non-penetrating cryoprotectants usually leads to significant osmotic instability of cells and the change of quantitative composition of cytoskeletal proteins [1, 28, 31], whilst the combination of penetrating cryoprotectants with polymers provides higher quantitative and qualitative indices for many cells after their freezing, including stem cells of peripheral blood [19, 29], non-fractionated cells of bone marrow [33], granulocytes [24], lymphocytes [30], erythrocytes [7, 8], human

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

мозга [33], гранулоциты [24], лим-фоциты [30], эритроциты [7,8], клетки поджелудочной железы человека [25], клетки эмбриональной печени человека [11]. Использование комбинированного криоконсерванта устраняет необходимость контролировать скорость замораживания и повышение осмотической устойчивости размороженных клеток [7, 8, 25, 33].

При замораживании эритроцитов необходимо использовать проникающие криопротекторы [2, 4], концентрацию которых можно уменьшить при их сочетании с полиэтиленгликолями или поливинилпирролидоном [7, 8]. Однако концентрация проникающего криопротектора существенно превышает его концентрацию при замораживании других клеток в подобных средах. Данные литературы указывают на общие причины повреждения различных клеток, которые устраняют комбинированные криоконсерванты [19, 29, 33].

Устранение отрицательного влияния высокой плотности клеток при замораживании требует присутствия в среде сахарозы и проникающих криопротекторов при условии, что концентрация соли должна быть ниже изотонической [13].

Цель работы – изучение эффективности непроникающих криопротекторов и их комбинации с проникающими при замораживании эритроцитов с низким гематокритом, т.е., когда исключается влияние повреждающих факторов, связанных с высокой плотностью клеток.

Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х.ч.), NH₄Cl (ч.д.а.), сахарозу(ч.д.а.), глюкозу(ч.д.а.); полиэтиленгликоли (ПЭГ) с молекулярной массой 1500, 2000, 3000, 4000 (Merck); декстраны с молекулярной массой 10000 (Декс-10) и 35000 (Декс-35) (Serva); глицерин производства Германии; 1,2-пропандиол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma). Эритроциты человека получали из донорской крови четырехкратным отмыванием раствором, содержащим 0,15 М NaCl, 10 мМ трис, pH 7,4 (солевая среда). Для получения растворов с различным содержанием NaCl и сахарозы солевую среду смешивали с раствором, содержащим 0,3 М сахарозы, 10 мМ трис, pH 7,4. Получали сахарозо-солевые среды: а) 100 мМ NaCl+100 мМ сахарозы; б) 75 мМ NaCl + 150 мМ сахарозы; в) 50 мМ NaCl + 200 мМ сахарозы; г) 25 мМ NaCl +250 мМ сахарозы. Растворы криопротекторов в концентрациях 5-20% готовили на указанных сахарозо-солевых средах или солевой среде, содержащей 0,15 М NaCl+0,4 М сахарозы, которые включали 10 мМ трис, pH 7,4. Эритроциты с гематокритом 8% инкубировали 30 мин при 25°C

pancreas cells [25], cells of human embryonic liver [11]. Combined preservative eliminates the necessity of controlling the freezing rate and increasing osmotic resistance of thawed cells [7, 8, 25, 33].

The penetrating cryoprotectants [2, 4], the concentrations of those may be reduced at their combination with polyethylene glycols (PEG) and polyvinyl pyrrolidones (PVP) should be used during freezing of erythrocytes [7, 8]. However the concentration of penetrating cryoprotectants considerable exceeds its concentration when freezing other cells under similar media. The literature data indicate to the common reasons of damaging different cells, being eliminated by combined cryopreservatives [19, 29, 33].

The elimination of negative effect of high density of cells during freezing demands the presence in the medium of sucrose and penetrating cryoprotectants upon the condition that salt concentration should be lower than isotonic one [13]. The research aim is the study of efficiency of non-penetrating cryoprotectants and their combination with the penetrating ones during freezing erythrocytes with low hematocrit, *i.e.* when the effect of damaging factors due to high density of cells is excluded.

Materials and methods

In the research NaCl (chemically pure), NH₄Cl (pure for analysis), sucrose (pure for analysis), glucose (pure for analysis); polyethylene glycols (PEG) with molecular mass of 1500, 2000, 3000, 4000 (Merck); dextrans with molecular mass of 10000 (Dex-10) and 35000 (Dex-35) (Serva); glycerol (Germany); 1,2-propane diol (1,2-PD); dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) were used. Human erythrocytes were derived from donor's blood with 4-fold washing out with the solution containing 0.15M NaCl, 10 mM tris, pH 7.4 (saline). To obtain the solutions with different content of NaCl and sucrose the saline was mixed with the solution, containing 0.3M sucrose, 10mM tris, pH 7.4. The resulted sucrose-saline media were as follows: a) 100 mM NaCl + 100 mM sucrose; b) 75 mM NaCl + 150 mM sucrose; c) 50 mM NaCl + 200 mM sucrose; d) 25 mM NaCl + 250 mM sucrose. The solutions of cryoprotectants under concentrations of 5-20% were prepared either with the mentioned sucrose-saline media or the saline comprising 0.15M NaCl + 0.4 M sucrose, containing 10 mM tris, pH 7.4. The erythrocytes with 8% hematocrit were incubated for 30 min at 25°C in the saline, containing 5% penetrating cryoprotectants. The samples of erythrocytes in freezing media of 1 ml volume and 0.8 and 40% hematocrits were placed into polyethylene vials and plunged into liquid nitrogen (cooling rate was 500-580°C/min), afterwards they were maintained for 30 min and then transferred on water bath at 40°C for 3 min. After

в солевой среде, содержащей проникающие криопротекторы в концентрации 5%. Образцы эритроцитов в средах замораживания с объемом 1 мл и гематокритами 0,8 или 40% в полиэтиленовых пробирках погружали в жидкий азот (скорость охлаждения 500-580°С/мин), выдерживали 30 мин, затем переносили на водяную баню при 40°С на 3 мин. После оттаивания образцы разводили соответствующими средами замораживания до гематокрита ~0,4% и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Процент гемолиза и процент сохранности вычисляли после спектрофотометрического определения оптической плотности надосадочной жидкости при длине волны 543 нм:

$$\text{процент гемолиза} = [A_1/A_2] \times 100,$$

$$\text{процент сохранности} = 100\% - \% \text{ гемолиза},$$

где A_1 – оптическая плотность надосадочной жидкости экспериментального образца; A_2 – оптическая плотность при полном гемолизе контрольного образца.

Среднее значение и дисперсию случайной величины рассчитывали с учетом результатов, полученных на эритроцитах от пяти доноров. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали t-критерий Стьюдента при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Снижение концентрации NaCl при замещении его на сахарозу приводит к повышению сохранности эритроцитов в цикле замораживания-оттаивания. Наличие в среде замораживания ПЭГ-1500 в концентрации 5-15% повышает сохранность клеток (рис.1, а). Изменение количества соли при содержании полимера 10-15% не сказывается на степени сохранности эритроцитов в цикле замораживания-отогрева. При увеличении концентрации ПЭГ-1500 до 20% снижение концентрации NaCl приводит к значительному повреждению эритроцитов (рис.1, а). Если в подобном эксперименте ПЭГ-1500 заменить на ПЭГ-2000, то при его содержании 20% уменьшение количества соли незначительно снижает сохранность клеток после замораживания (рис.1, б).

Эксперименты с декстранами показали, что данные полимеры меньше повышают сохранность эритроцитов в цикле замораживания-отогрева. Однако при снижении количества соли, при концентрациях декстранов 20% не выявляется роста повреждения клеток (рис.1, в, г).

Полученные результаты указывают на то, что в цикле замораживания-отогрева изменяется криопротекторное действие полиэтиленгликолей, которое зависит от ионной силы криоконсерванта, в то же время с декстранами этого не отмечается.

thawing the samples were diluted with corresponding freezing media down to ~0.4% hematocrit and centrifuged for 5 min at 3000 rot/min. After spectrophotometrical examining of optical density of supernatant fluid at 543 wavelength the hemolysis percentage and the one of survival was calculated:

$$\text{hemolysis percentage} = [A_1/A_2 \times 100] \text{ and}$$

survival percentage = 100% - hemolysis %, where A_1 – optical density of supernatant fluid of experimental sample; A_2 – optical density at a complete hemolysis of the control sample.

An average value and dispersion of random value was calculated using the result obtained in erythrocytes from 5 donors. The results are presented as a mean \pm SE. To examine statistical significance of the results Student's t-criterion was used at $P < 0.05$.

Results and discussion

Decrease in NaCl concentration when substituting it to sucrose results in a rise of erythrocyte survival in the cycle of freeze-thawing. The presence of 5-15% PEG-1500 in the medium increases the cell survival rate (Fig. 1, a). The change in salt amount in 10-15% polymer component presence does not affect the rate of erythrocyte survival during freeze-thawing. At increased PEG-1500 concentration up to 20% the reduction of NaCl concentration leads to a significant increase of erythrocyte impairments (Fig. 1, a). If in similar experiment PEG-1500 to change for PEG-2000, then at its 20% presence the decrease of salt amount cause a slight reduction in cell survival after thawing (Fig. 1, b).

The experiments with dextrans have shown that these polymers increase in less extent the survival of erythrocytes in the cycle of freeze-thawing. However during the decrease of the salt amount under dextran concentrations up to 20% no increase in cell damages is found (Fig. 1, c, d).

The obtained results point to the fact that in freeze-thawing cycle the cryoprotective effect of polyethylene glycols changes, which depends on ionic strength of cryopreservative, at the same time this is not observed in the presence of dextrans.

Since in the described experiments the decrease in NaCl concentration in freezing medium was accompanied with corresponding rise of sucrose amount, then probability of its effect on cryoprotective properties of PEG-1500 is not excluded. In the experiments, where NaCl was substituted with NH_4Cl , the results have demonstrated that substitution of non-penetrating cation (Na^+) on penetrating (NH_4^+) results in a significant change of the survival curve depending on NH_4Cl content (Fig. 2, a in comparison with Fig. 1, curve 5). In addition, the rise in sucrose concentration at a fixed NH_4Cl amount reduces the erythrocyte survival after freezing (Fig. 2, b).

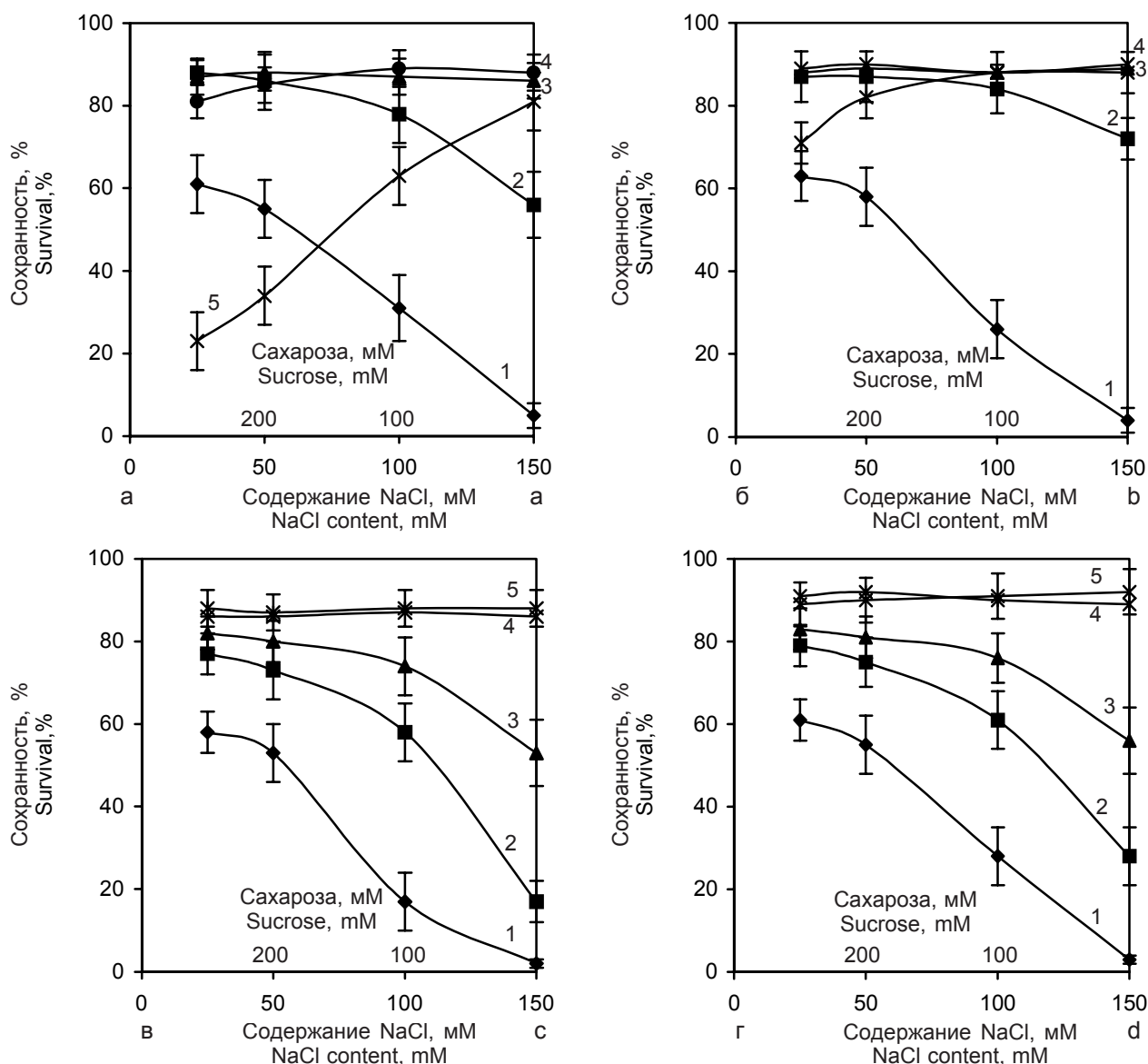


Рис.1. Влияние повышения концентрации ПЭГ-1500 (а); ПЭГ-2000 (б); Декс-10 (в); Декс-35 (г) на зависимость сохранности эритроцитов при замораживании с низким гематокритом в среде с различными концентрациями NaCl и сахарозы. Концентрация полимеров, %: 1–0; 2–5; 3–10; 4–15; 5–20.

Fig. 1. Effect of concentration increase of PEG-1500 (a); PEG-2000 (b); Dex-10 (c); Dex-35 (d) to the survival relation of erythrocytes during freezing with low hematocrit in medium with different concentrations of NaCl and sucrose. Polymer concentration, %: 1–0; 2–5; 3–10; 4–15; 5–20.

Поскольку в описанных экспериментах снижение концентрации NaCl в среде замораживания сопровождалось соответствующим повышением количества сахарозы, то вероятность ее влияния на криопротекторные свойства ПЭГ-1500 не исключается. В экспериментах NaCl заменили на NH_4Cl . Как показали результаты, замена непроницающего катиона (Na^+) на проникающий (NH_4^+) приводит к незначительному изменению кривой сохранности в зависимости от содержания NH_4Cl (рис.2, а, в сравнении с рис.1, а, кривая 5). Кроме того, рост концентрации сахарозы при фиксированном количестве NH_4Cl снижает сохранность эритроцитов после замораживания (рис.2, б).

Thus, cryoprotective effect of PEG-1500 depends not only on ionic strength but likely on sucrose amount in cryopreservative.

Fig. 3 shows the results of comparative freezing of erythrocytes with different hematocrit. In suspension with high hematocrit no dependency of the survival on ionic strength is revealed. This effect can be determined by several causes. First of all, dehydration of much bigger amount of cells decreases polymer concentration. Secondly, the release of K^+ cations out of bigger number of cells will result in some rise of ionic strength of the medium. Increased area of sorbing surface (total area of the membranes) in respect of the amount of sorbate, usually changes the character

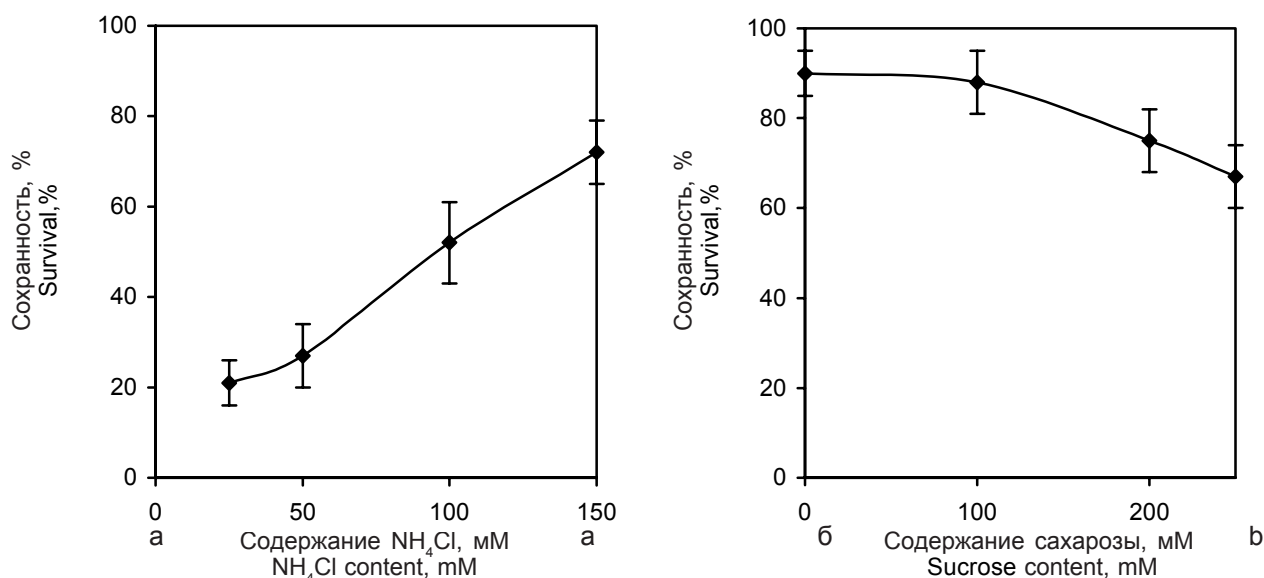


Рис. 2. Сохранность эритроцитов, замороженных с ПЭГ-1500 (концентрация 20%) в сахарозо-солевых средах: а – 0,3 М сахарозы и различные концентрации NH_4Cl ; б – 0,15 М NH_4Cl и различные концентрации сахарозы.

Fig. 2. Survival of erythrocytes frozen with PEG-1500 (20% concentration) in sucrose-saline media: a – 0.3 M of sucrose and different NH_4Cl concentration; b – 0.15 M NH_4Cl and different sucrose concentration.

Таким образом, криопротекторное действие ПЭГ-1500 зависит не только от ионной силы, но, возможно, и от количества сахарозы в криоконсерванте.

На рис. 3 представлены результаты сравнительного замораживания эритроцитов с различным гематокритом. В суспензии с высоким гематокритом не выявляется зависимости сохранности от ионной силы. Такой эффект может определяться: во-первых, дегидратацией значительно большего количества клеток в суспензии с высоким гематокритом, что уменьшает концентрацию полимера. Во-вторых, выброс катионов K^+ из большего количества клеток приведет к некоторому повышению ионной силы среды. Увеличение площади сорбирующей поверхности (суммарная площадь мембран), по отношению к количеству сорбата, обычно изменяет степень и характер адсорбции полимера [6].

Как показано на рис. 4, присутствие в среде проникающих криопротекторов в комбинации с ПЭГ-1500 параллельно с ростом сохранности устраняет зависимость повреждения эритроцитов от ионной силы среды. Степень выраженности эффекта зависит от вида проникающего криопротектора и располагается в ряду: глицерин = ДМСО > глюкоза > 1,2-ПД.

Для выяснения баланса протектирующего и повреждающего действия полиэтиленгликолей и декстранов были проведены эксперименты в среде с высоким содержанием сахарозы при замене катиона Na^+ на проникающий катион NH_4^+ . Эритроциты замораживали в сахарозо-солевых средах с различной концентрацией данных компонентов. При содержании NaCl 0,15 М содержание сахарозы

of polymer adsorption character [6].

As Fig. 4 shows the presence of penetrating cryoprotectants in combination with PEG-1500 in the medium in parallel with the growing survival rate eliminates the dependence of erythrocyte damage on the medium ionic strength. The manifestation rate of the effect depends on the type of penetrating cryoprotectants and is within the row: glycerol = DMSO > glucose > 1,2-PD.

For revealing the balance of protecting and damaging effects of polyethylene glycols and dextrans the experiments were done in the medium with high sucrose at the substitution of Na^+ action to NH_4^+ penetrating one. The erythrocytes were frozen in sucrose-saline media with different concentrations of these components. When NaCl content was 0.15M the sucrose content under 0.4 M concentration was critical, above which there is observed the decrease of erythrocyte integrity (Fig. 5a). Under sucrose concentrations higher than 0.4M general negative contribution of salt and non-electrolyte in the effect of solution concentrating during freezing is manifested, which renders damaging effect [26]. The substituting of Na^+ to NH_4^+ results in the change of behaviours of the dependency curves of integrity on concentration of sucrose and NH_4Cl (Fig. 5, b).

Herewith more manifested increase of integrity is noted in the media containing 0.4-0.6M sucrose. This points to the fact that under these concentrations the sucrose contribution into osmotic gradient is the highest one. For the following experiment the solution containing 0.15M NaCl and 0.4 M sucrose, the composition of which is critical during freezing of erythrocytes was used (Fig. 5a).

зы в концентрации 0,4 М является критическим, выше которой наблюдается снижение сохранности эритроцитов (рис. 5, а). При концентрациях сахарозы выше 0,4 М проявляется общий отрицательный вклад соли и неэлектролита в эффект концентрирования раствора при замораживании, который оказывает повреждающее воздействие [26]. Замена Na^+ на NH_4^+ приводит к изменению поведения кривых зависимости сохранности от концентрации сахарозы и NH_4Cl (рис. 5, б). При этом более существенный рост сохранности отмечается в средах, содержащих 0,4-0,6 М сахарозы. Это указывает на то, что при таких концентрациях вклад сахарозы в осмотический градиент наибольший. Для следующего эксперимента использовали раствор, содержащий 0,15 М NaCl и 0,4 М сахарозы, состав которого является критическим при замораживании эритроцитов (рис. 5, а). Присутствие в данной сахарозо-солевой среде полиэтиленгликолей и декстранов различных молекулярных масс вызывает снижение сохранности в ряду ПЭГ-1500>ПЭГ-2000>ПЭГ-3000>ПЭГ-4000>Декс-10=Декс-35. При замене катиона Na^+ на NH_4^+ отмечается рост сохранности, которая наиболее выражена в среде с ПЭГ-1500 (рис. 6). Из этого следует, что чем ниже молекулярная масса полимера, тем больше баланс его протектирующего и повреждающего действия зависит от степени

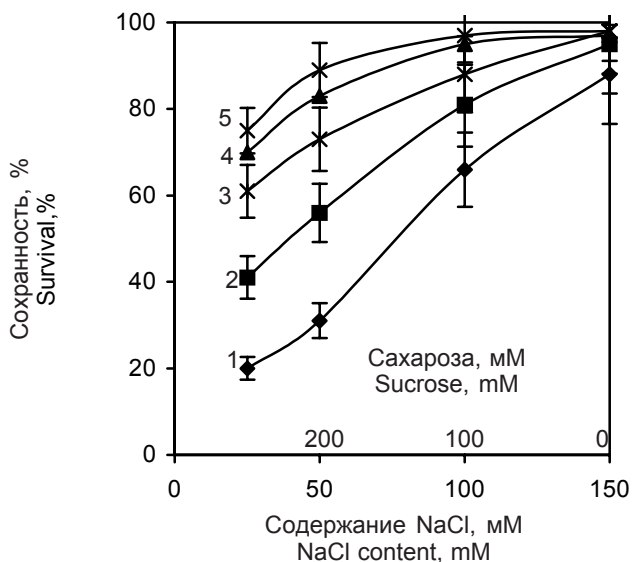


Рис.4. Влияние проникающих криопротекторов (концентрация 5%) на сохранность эритроцитов при замораживании с низким гематокритом с различными концентрациями NaCl и сахарозы в среде с ПЭГ-1500 (концентрация 20%): 1 – контроль; 2 – 1,2-ПД; 3 – глюкоза; 4 – ДМСО; 5 – глицерин.

Fig. 4. Effect of penetrating cryoprotectant (5% concentration) to erythrocytes survival during freezing with low hematocrit with different concentrations of NaCl and sucrose in the media with PEG-1500 (20% concentration): 1 – control; 2 – 1.2-PD; 3 – glucose; 4 – DMSO; 5 – glycerol.

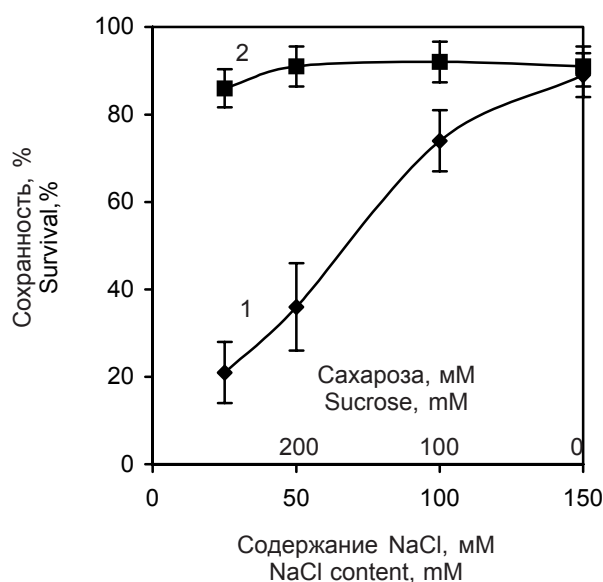


Рис. 3. Сохранность эритроцитов, замороженных с ПЭГ-1500 (концентрация 20%) в сахарозо-солевых средах с различным гематокритом, %: 1 – 0,8; 2 – 40.

Fig. 3. Survival erythrocytes of frozen with PEG-1500 (20% concentration) in the sucrose-saline media with different hematocrit, %: 1 – 0.8; 2 – 4.

The presence of polyethylene glycols and dextrans of different molecular masses in this sucrose-salt medium causes a reduced integrity in the raw: PEG-1500>PEG-2000>PEG-3000>PEG-4000>Dex-10=Dex-35. When changing Na^+ to NH_4^+ there is found a growth of integrity which is the most manifested in the medium with PEG-1500 (Fig. 6). This implies that the lower molecular mass of polymer, the bigger dependence of the balance of its protecting and damaging effect on the rate of growing osmotic gradient on cell membrane during freezing. Satisfactory integrity of erythrocytes during freezing requires the certain ratio of PEG-1500 and sucrose, its change results in the growth of cell damage rate [12].

According to the literature data the salt concentration decrease from 150 down to 1 mM causes the “decondensation” of not only glycocalyx (from 5 to 12 nm) [23], but also the field of polar heads of phospholipids (from 0.44 to 0.80 nm) and even some hydrophobic layer of membrane (from 3.42 to 3.52 nm) [16]. The reduction of ionic strength of the medium significantly increase electrophoretic mobility of erythrocytes, that is related to the “decondensation” of double electric layer and growth of electrokinetic cell potential [20]. The growth of negative potential of lipid bilayer surface results in the fall of surface pressure down to zero and interphase one down to the certain critical value. If the potential of bilayer surface reaches -98 mV, then membrane loses its stability and erythrocyte lysis starts [20]. Generally surface tension may be lowered due to two causes: substitution of the surface by less polar molecules, increase of

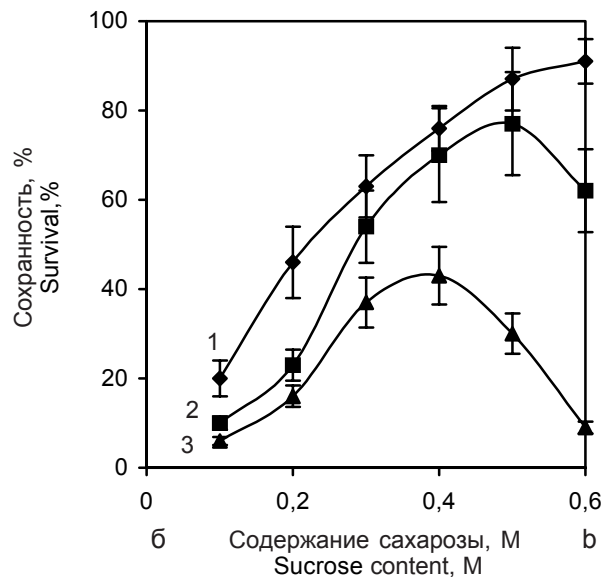
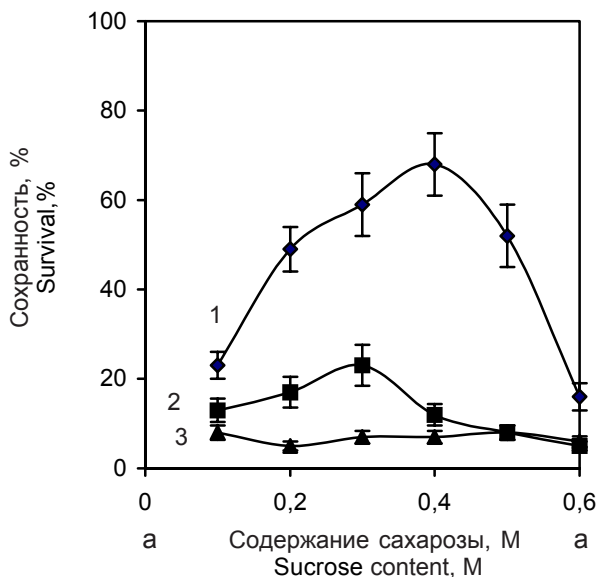


Рис. 5. Сохранность эритроцитов после замораживания в сахарозо-солевых средах (а): 1–0,15 М NaCl; 2–0,3 М NaCl; 3–0,45 М NaCl; (б): 1–0,15 М NH₄Cl; 2–0,3 М NH₄Cl; 3–0,45 М NH₄Cl.

Fig. 5. Survival of erythrocytes after freezing in sucrose-saline media (a): 1–0.15 M NaCl; 2–0.3 M NaCl; 3–0.45 M NaCl; (b): 1–0.15 M NH₄Cl, 2–0.3 M NH₄Cl, 3–0.45 M NH₄Cl.

нарастания осмотического градиента на мембране клеток при замораживании. Удовлетворительная сохранность эритроцитов при замораживании требует определенного соотношения ПЭГ-1500 и сахарозы, изменение его приводит к росту степени повреждения клеток [12].

Согласно данным литературы снижение концентрации соли от 150 до 1 мМ вызывает “разрыхление” не только гликокаликса (от 5 до 12 нм) [23], но и области полярных головок фосфолипидов (от 0,44 до 0,80 нм) и даже гидрофобного слоя мембраны (от 3,42 до 3,52 нм) [16]. Снижение ионной силы среды существенно повышает электрофоретическую подвижность эритроцитов, что связано с “разрыхлением” двойного электрического слоя и ростом электрокинетического потенциала клетки [20]. Рост отрицательного потенциала поверхности липидного бислоя вызывает падение поверхностного давления до нуля, а межфазного – до определенного критического значения. Если потенциал поверхности бислоя достигает 98 мВ, то мембрана теряет свою стабильность и наступает лизис эритроцитов [20]. В общем случае поверхностное натяжение может понижаться по двум причинам: замещение поверхности менее полярными молекулами, увеличение в поверхностном слое межмолекулярного расстояния вследствие теплового движения и взаимнообмена молекул поверхности и объема [32].

Когда эритроциты суспендируют в растворах с полимерами, часть противоионов исключается от заряженной поверхности и, как предполагают, это приводит к усилению электрофоретической под-

intermolecular distance in surface layer due to heat moment and inter-exchange of the surface and volume molecules [32].

When erythrocytes suspend in the solution with polymers the part of anti-ions is excluded from the charged surface and as it is supposed this result in the strengthening of electrophoretic mobility. It is assumed that adsorption of dextrans is accompanied by dynamic exchange of macromolecules between the membrane and volumetric phase of the solution [32]. Herewith electrophoretic mobility depends not only on the charge density but also on the thickness of glycocalyx and the parameter of electroosmotic flux inside it.

Glycocalyx “decondensation” is associated to the inclusion into it of hydrophilic molecules of dextran, inducing osmotic forces and swelling. This structural rearrangement supposes bigger dynamics of fluid flux near the surface and strengthening of cell mobility [32]. Single washing-out of erythrocytes from dextran results in recovery of electrophoretic mobility of cells up to normal value. This testifies to a rapid desorption of slightly-adsorbed polymer molecules [32].

The character of polymer interactions with cell surface is determined by electrokinetic potential (ζ -potential), which is significantly increased at the reduced ionic strength [9]. It is considered that the rise in ζ -potential with the growth of adsorption of polymers is related to the shifting of slide plane into the solution depth [9], that is in accordance with the notion about the widening of diffusive part of electrical double layer [17, 18]. The change in electrostatic structure of cell inter-phase is the consequence of the formation of the layer with low viscosity, exhausted

вижности. Принимается, что адсорбция декстранов сопровождается динамическим обменом макромолекул между мембраной и объемной фазой раствора [32]. При этом электрофоретическая подвижность зависит не только от плотности заряда, но и от толщины гликокаликса и параметра электроосмотического потока внутри его. "Разрыхление" гликокаликса связано с включением в него гидрофильных молекул декстрана, что индуцирует осмотические силы и набухание. Такая структурная перестройка предполагает большую динамику потока жидкости вблизи поверхности и усиление подвижности клеток [32]. Однократное отмывание эритроцитов от декстрана приводит к восстановлению электрофоретической подвижности клеток до нормального значения. Это свидетельствует о быстрой десорбции слабо адсорбированных молекул полимера [32].

Характер взаимодействия полимеров с клеточной поверхностью определяется электрокинетическим потенциалом (ζ -потенциал), который существенно возрастает при снижении ионной силы [9]. Считают, что повышение ζ -потенциала с ростом адсорбции полимеров связано со смещением плоскости скольжения в глубь раствора [9], что согласуется с представлением о расширении диффузной части двойного электрического слоя [17,18]. Изменения в электростатической структуре интерфазы клетки являются следствием образования слоя с низкой вязкостью, истощенного от полимера, который разделяет адсорбированный слой и раствор полимера [15].

Исследование частотной зависимости электропроводности суспензии эритроцитов показало, что присутствие сахарозы или ПЭГ-1500 в растворе вызывает большую зависимость электропроводности от частоты тока. При этом совместное действие двух неэлектролитов дает суммарный эффект. Присутствие в среде изотонической концентрации соли устраняет данный эффект. Повышение частотной зависимости электропроводности связывают с увеличением поверхностной активности сахарозы и ПЭГ-1500 [3].

Удаление ПЭГ-1500 из раствора приводит к восстановлению нормальной формы эритроцитов, из чего сделали заключение, что поверхностные силы слабы и взаимодействие является обратимым [5]. Однако в условиях замораживания даже такая слабая адсорбция приводит к необратимому включению молекул ПЭГ-1500 в образующиеся микротрещины мембран [10]. Снижение температуры смешивания данного полимера с эритроцитами существенно уменьшает его связывание с мембранами и повышает степень сохранности клеток при последующем их замораживании [1]. Из этого следует, что величина адсорбции

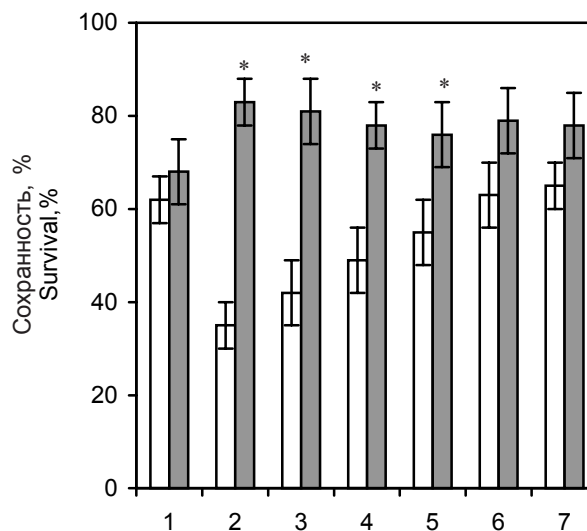


Рис. 6. Сохранность эритроцитов после замораживания в сахарозо-солевых средах, содержащих различные полимеры в концентрации 5%: 1 – контроль; 2 – ПЭГ-1500; 3 – ПЭГ-2000; 4 – ПЭГ-3000; 5 – ПЭГ-4000; 6 – Декс-10; 7 – Декс-35. □ – среды содержат 0,4 М сахарозы+0,15 М NaCl. ■ – среды содержат 0,4 М сахарозы+0,15 М NH₄Cl. * – статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями сохранности эритроцитов при замораживании в среде с NaCl (P<0,05).

Fig. 6. Erythrocytes' survival after freezing in sucrose-saline media contained different polymers in 5% concentration: 1 – control; 2 – PEG-1500; 3 – PEG-2000; 4 – PEG-3000; 5 – PEG-4000; 6 – Dex-10; 7 – Dex-35. □ – media contain 0.4 M sucrose + 0.15 M NaCl. ■ – media containing 0.4 M sucrose + 0.15 M NH₄Cl. * – statistically significant if compared with corresponding figures of erythrocytes integrity after freezing in medium with NaCl (P>0.05).

with polymer which stratify the adsorbed layer and polymer solution [15].

The studying of the frequency dependence of electrical conductivity of erythrocyte suspension has shown that the presence of sucrose or PEG-1500 in the solution causes a great dependence of electrical conductivity on the current frequency. Herewith a combined effect of two non-electrolytes provides a summarized effect. The presence of isotonic salt concentration in the medium eliminates this effect. The increase of frequency dependence of electrical conductivity is associated with the rise of surface activity of sucrose and PEG-1500 [3].

The removal of PEG-1500 out of the solution results in the recovery of normal shape of erythrocytes, that leads to conclusion that surface forces are weak and the interaction is reversible one [5]. However under freezing even such a weak adsorption results in irreversible inclusion of molecules of PEG-1500 into the forming micro-cracks of the membranes [10]. The reduced temperature of this polymer mixing with erythrocytes significantly diminishes its binding with the membranes and the rate of cell damage during following freezing [1]. This implies that polymer

полимера будет сказываться на степени включения молекул ПЭГ-1500 в мембрану.

Во многих случаях адсорбция полимеров на поверхности сопровождается увеличением энтальпии. Самопроизвольный процесс адсорбции с увеличением теплосодержания должен сопровождаться значительным ростом энтропии, что происходит за счет десорбции растворителя [6]. Высокая осмотическая активность полиэтиленгликолей определяется связыванием воды и ее многослойным структурированием вокруг молекул полимера [9]. Такая связанная вода уже не обладает свойством растворителя для солей и неэлектролитов, что приводит к концентрированию растворов [9]. Включение клеток в такие среды вызывает дегидратацию не только цитоплазмы, но и мембраны [22]. Изменение гидратационных свойств воды, понижение диэлектрической константы и полярности раствора оказывают значительное влияние на гидрофильно-гидрофобный баланс на поверхности мембраны [27], что ослабляет гидрофобные взаимодействия в липидном бислое [21].

Таким образом, снижение ионной силы декомпактирует все области клеточной мембраны и "разрыхляет" двойной электрический слой. Рост отрицательного потенциала поверхности бислоя приводит к падению поверхностного и межфазного давления и к дестабилизации мембраны. Полимеры расширяют двойной электрический слой, дополнительно понижая поверхностное натяжение мембраны, изменяя гидратационные свойства воды и полярности раствора, что приводит к дегидратации цитоплазмы и мембраны и изменению гидрофильно-гидрофобного баланса на поверхности клетки с последующим ослаблением гидрофобных взаимодействий в липидном бислое. В такой ситуации адсорбция ПЭГ-1500 вызывает потерю стабильности мембран еще до замораживания и необратимое включение его молекул в микротрещины мембран при замораживании, вследствие чего вероятность репарации мембран при размораживании и ресуспендировании сводится к нулю.

Однако при замораживании не все полимеры проявляют повреждающее действие при снижении ионной силы. Как показали результаты исследований, данный эффект зависит от молекулярной массы полиэтиленгликолей, а в случае декстранов он не выявляется (см. рис.1). Из этого следует, что протектирующее действие полимеров с высокой молекулярной массой (на примере использованных декстранов) не зависит от ионной силы среды.

Использование проникающих криопротекторов в невысоких концентрациях (5%) и существенные различия в их действии (см. рис.4) приводят к

adsorption value will affect the rate of inclusion of PEG-1500 molecules into membrane.

In many cases the adsorption of polymer on a surface is accompanied with a rise in enthalpy. Spontaneous process of adsorption with a rise in heat content should be accompanied with significant rise of entropy, resulting from the desorption of a solvent [6]. High osmotic activity of polyethylene glycols is determined by water binding and its multilayer structuring around the molecules of polymer [9]. This bound water does not have the properties of a solvent both for salts and non-electrolytes, leading to the concentrating of the solutions [9]. Inclusion of cells in these media causes the dehydration of not only cytoplasm but also membrane [22]. Alteration of hydrating properties of water, lowering of dielectrical constant and polarity of the solution affect significantly the hydrophilic-hydrophobic balance on membrane surface [27], thereby weakening hydrophobic interactions in lipid bilayer [21].

Thus the reduction of ionic strength results in decompactization of all the sites of cell membrane and "decondensation" of electrical double layer. Growing negative potential of bilayer surface results in the fall of surface and inter-phase pressures and membrane destabilization. Polymers extend electrical double layer by additional rising of membrane surface tension, by changing hydrating properties of water and solution polarity, leading to dehydration of cytoplasm and membranes and the change of hydrophilic-hydrophobic balance on a cell surface with following weakening of hydrophobic interactions in lipid bilayer. In this situation PEG-1500 adsorption causes the loss of membrane stability even before freezing and irreversible inclusion of its molecules into microcracks of membranes at freezing resulting in nullification of the reparation of membranes during freezing and re-suspending.

However during freezing not all polymers manifest damaging effect during reduction of ionic strength. The research results show, that this effect depends on molecular mass of polyethylene glycols, and in case of dextrans it is not revealed (Fig. 1). It implies that protecting effect of polymers with high molecular mass (as exemplified with dextrans) does not depend on medium ionic strength.

Penetrating cryoprotectants under low concentrations (5%) and significant differences in their action (Fig. 4) result in supposition that if damaging effect of PEG-1500 at reduced ionic strength is associated to the change in the character of its adsorption on membrane surface, then elimination of negative effect with penetrating cryoprotectants is likely caused by their stabilizing influence on membrane under direct binding and lessening of adsorption activity of polymer. Cryoprotective effect of glycerol and DMSO is related to their interaction with polar heads of phospholipids

предположению: если повреждающее действие ПЭГ-1500 при снижении ионной силы связано с изменением характера его адсорбции на поверхности мембраны, то устранение отрицательного эффекта с проникающими криопротекторами, видимо, вызвано их стабилизирующим воздействием на мембрану при непосредственном связывании и уменьшении адсорбционной активности полимера. Криопротекторное действие глицерина и ДМСО связано с их взаимодействием с полярными головками фосфолипидов за счет образования водородных связей и расширения монослоев мембраны [14].

Выводы

Полученные результаты показали, что при 20%-й концентрации ПЭГ-1500 снижение ионной силы среды вызывает значительное ослабление криопротекторной эффективности данного полимера с выявлением его отрицательного влияния на сохранность замороженных эритроцитов. Данный эффект не выявляется, если эритроциты замораживать с высоким гематокритом, и становится менее выраженным, если в среду замораживания включить проникающий криопротектор. Такие результаты приводят к предположению о том, что изменение ионной силы или гематокрита вызывает изменение адсорбции ПЭГ-1500 на поверхности эритроцитов.

Анализ полученных данных показывает, что чем ниже молекулярная масса полимера, тем сильнее зависимость его протектирующего действия от ионной силы и концентрации сахарозы в среде замораживания.

Литература

1. *Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г.* Влияние температуры и криопротектора ПЭО-1500 на характер модификации белков цитоскелета и устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 1994.– №2.– С.7-11.
2. *Гаверилов О.К., Аграненко В.А.* Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии: Метод. рекомендации.– М., 1980.– 35 с.
3. *Гордиенко О.И., Некоз И.Л., Шейкин В.И.* Водный диффузионный обмен и электрические характеристики эритроцитов в средах с криопротекторами // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.– Киев: Наук. думка.– 1990.– С. 36-41.
4. *Грищенко В.И., Воротилин А.М., Гучок В.М. и др.* Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта "Пропандиосахароль": Метод. рекомендации.– Харьков, 1990.– 12 с.
5. *Кочережская И.А.* Электрические и структурные параметры эритроцитов в криозащитных растворах, содержащих полиэтиленоксид: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1984.– 23 с.
6. *Липатов Ю.С.* Межфазные явления в полимерах.– Киев: Наук. думка, 1980.– 259 с.

due to the formation of hydrogen bonds and widening of membrane monolayers [14].

Conclusions

Obtained results have shown that under 20% PEG-1500 the reduction of ionic strength causes significant weakening of cryoprotective activity of this polymer with the revealing of its negative influence on the integrity of frozen erythrocytes. This effect is not revealed if the erythrocytes are thawed with high hematocrit and becomes less manifested if in the freezing medium penetrating cryoprotectant is included. These results result in the supposition that the change of ionic strength or hematocrit lead to the alterations of PEG-1500 adsorption on erythrocyte surface.

The analysis of the obtained results show that the lower molecular mass of polymer, the stronger the dependency of its protective effect on ionic strength and sucrose concentration in freezing medium.

References

1. *Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* Effect of temperature and cryoprotectant PEG-1500 on character of protein modification of cytoskeleton and erythrocytes viability in cryopreservation process// Problems of Cryobiology.–1994.– №2.– P.7-11.
2. *Gavrilov O.K., Agranenko V.A.* Methods of long-term storage in frozen erythrocytes meant for transfusion: Method. Recom.– Moscow.– 1980.– P. 35.
3. *Gordienko O.I., Nekoz I.L., Sheykin V.I.* Water diffusion transfer and electric characteristics of erythrocytes in medium with cryoprotectant// Physicochemical properties and biological effect of cryoprotectant.– Kiev: Naukova dumka.– 1990.– P. 36-41.
4. *Grischenko V.I., Vorotilin A.M., Guchok V.M. et al.* Erythrocytes cryopreservation under protection of "Propandiosaccharol" cryopreservative. Method. Recom.– Kharkov, 1990.– P.12.
5. *Kocherezhskaya I.A.* Electric and structural parameters of erythrocytes in cryoprotective solutions containing polyethylene oxide. Author abstract of the thesis of doctor of biol. sciences.– Kharkov, 1984.– P. 23.
6. *Lipatov Yu.S.* Interphase phenomena in polymers.– Kiev: Naukova dumka, 1980.– P. 259.
7. *Mezhidov S.Kh., Belyaeva I.M., Vorotilin A.M., Moiseev V.A.* Effect of combination of polyvinylpyrrolidone and 1.2-propandiol to erythrocytes survival at cryopreservation// Problems of cryobiology.– 1996.– №2.– P. 22-25.
8. *Mezhidov S.Kh., Moiseev V.A.* Effect of combination of high molecular cryoprotectants with 1.2-propandiol to the erythrocytes survival at cryopreservation// Problems of Cryobiology.–1995.– №3.– P. 46-48.
9. *Nepper D.* Stabilization of colloidal dispersion with polymers.– Moscow: Mir, 1986.– P. 487.
10. *Novikov A.N., Oleynik S.T., Chernysh E.N., Pashkovskay O.V.* Adsorptive reduction stability of erythrocytes membranes at cold effect PEG-1500 // Kriobiologiya i Kriomedicina .– 1984.– Vol. 14.– P. 40-44.
11. *Petrenko Yu.A.* Cryopreservation of human embryonic liver cells with using DMSO and high molecular polymers// Problems of Cryobiology.– 2003.– №3.– P. 80-87.

7. Межидов С.Х., Беляева И.М., Воротилин А.М., Мусеев В.А. Влияние сочетания поливинилпирролидона и 1,2-пропандиола на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Пробл. криобиологии.–1996.– №2.– С.22-25.
8. Межидов С.Х., Мусеев В.А. Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании // Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С.46-48.
9. Неппер Д. Стабилизация коллоидных дисперсий полимерами.– М.: Мир, 1986.– 487 с.
10. Новиков А.Н., Олейник С.Т., Черныш Е.Н., Пашковская О.В. Адсорбционное понижение прочности мембран эритроцитов при холодовом воздействии ПЭО-1500// Криобиология и криомедицина.– 1984.– В.14.– С.40-44.
11. Петренко Ю.А. Криоконсервирование клеток эмбриональной печени человека с использованием ДМСО и высокомолекулярных полимеров // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 80-87.
12. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4М NaCl // Криобиология.–1989.– №1.– С. 47-49.
13. Рамазанов В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом // Пробл. криобиологии.– 2006.– Т.16, №2.– С. 155-163.
14. Ancho doguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing// Cryobiology.–1987.– Vol.24, N4.– P. 324-331.
15. Arnold K., Zschornig O., Pratsch L. et al. Exclusion of PEG from membrane surfaces and aggregation of liposomes and lipoproteins // Stud. Biophys.–1988.– Vol.127, N1-3.– P. 113-120.
16. Ashcroft R.G., Coster H.G.L., Smith J.R. The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The dielectric structure of the hydrophilic/hydrophobic interface // Biochem. Biophys. Acta.–1981.– Vol.643.– P. 191-204.
17. Baumler H., Donath E. Does dextran indeed significantly increase the surface potential of human red blood cells// Stud. Biophys.– 1987.– Vol.120, N2.– P.113-122.
18. Brooks D.E., Seeman G.V.F. The effect of neutral polymers on the electrokinetic potential of cells and other charged particles. 1. Models for the zeta potential increase// J. Colloid and Interface Science.– 1973.– Vol.43, N3.– P. 670-686.
19. Clapissou G., Salinas C., Malacher P. et al. Cryopreservation with hydroxyethylstarch (HES) + dimethylsulphoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone // Bull Cancer.– 2004.– Vol.91, N4.– P. 97-102.
20. Dolowy K., Godlewski Z. Computation of the erythrocyte cell membrane parameters from electrophoretical and biochemical data: Stern-like electrochemical model of the cell membrane// J. Theor. Biol.– 1980.– Vol.84.– P. 709-723.
21. Herrmann A., Pratsch L., Arnold H., Lassmann G. Effect of poly(ethylene glycol) on the polarity of aqueous solutions and on the structure of vesicle membranes // Biochem. Biophys. Acta.– 1983.– Vol.733, N 1.– P. 87-94.
22. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // Biophys J.–1995.– Vol.68.– P. 525-535.
23. Lerche D. Spontaneous aggregation of washed human erythrocytes in isotonic media of reduced ionic strength. Conclusion about the spatial arrangement of the N-terminal part of the glycoporphins // Biorheology.–1982.– Vol.19.– P. 587-598.
24. Lionetti F.J., Hunt S.M., Gore J.M., Curby W.A. Cryopreservation of human granulocytes // Cryobiology.–1975.– Vol.12, N 3.– P.181-191.
25. Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulphoxide as cryoprotectants // Transplant Proc. 2004.– Vol.36, №4.– P. 1133-1134.
26. Meryman H.T., Williams R.J., Douglas M.S. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection // Cryobiology.– 1977.– Vol.14, N3.– P. 287-302.
27. Ohki S., Arnold K. Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion // J. Membr. Biol.–1990.– Vol.114.– P. 195-203.
28. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // Cryobiology.– 1997.– Vol.35, N2.– P.173-86.
29. Rowley S.D., Feng Z., Chen L. et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch // Bone Marrow Transplant.– 2003.– Vol.31, N11.– P.1043-1051.

25. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Transplant Proc.* 2004.– Vol.36, №4.– P. 1133-1134.
26. *Meryman H.T., Williams R.J., Douglas M.S.* Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection // *Cryobiology.*– 1977.– Vol.14, N3.– P. 287-302.
27. *Ohki S., Arnold K.* Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion // *J. Membr. Biol.*–1990.– Vol.114.– P. 195-203.
28. *Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M.* *In vitro* study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.*– 1997.– Vol.35, N2.– P.173-86.
29. *Rowley S.D., Feng Z., Chen L. et al.* A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch // *Bone Marrow Transplant.*– 2003.– Vol.31, N11.– P.1043-1051.
30. *Simon J.D., Lionetti F.J.* The cryopreservation of human lymphocytes // *Cryobiology.*– 1974.– Vol.11, N6.– P. 543.
31. *Singbartl K, Langer R, Henrich A.* Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes// *Cryobiology.*– 1998.– Vol.36, N2.– P. 115-123.
32. *Snabre P., Mills P.* Effect of dextran polymer on glycocalyx structure and cell electrophoretic mobility// *Colloid & Polymer Science.*–1985.– Vol. 263.– P. 494-500.
33. *Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al.* Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing // *Blood.*–1987.– Vol.70,N4.– P. 974-978.

Accepted in 09.01.06

Поступила 09.01.2006