

Постгипертонический стресс при замораживании эритроцитов в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами

В.В. РАМАЗАНОВ, Е.Л. ВОЛОВЕЛЬСКАЯ, В.А. КОПТЕЛОВ, В.А. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Posthypertonic Stress During Freezing of Erythrocytes in Media with non-Penetrating and Penetrating Cryoprotectants

V.V. RAMAZANOV, E.L. VOLOVELSKAYA, V.A. KOPTELOV, V.A. BONDARENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В методах криоконсервирования эритроцитов используются проникающие криопротекторы (глицерин, 1,2-пропандиол) в концентрации 20–40% или полимерные непроникающие криопротекторы (ПЭГ-1500, декстран) в концентрациях 20–30%. Применение проникающих криопротекторов в высокой концентрации требует отмывания эритроцитов гипертоническими растворами NaCl для предупреждения развития постгипертонического гемолиза. Замораживание клеток с полимерами приводит к повреждению мембран в основном из-за гипертонического стресса, который также является причиной развития постгипертонического гемолиза при отогреве и отмывании криоконсерванта. Целью исследования была разработка состава сред, которые будут обеспечивать сохранение осмотических свойств эритроцитов при замораживании-отогреве и упрощать их отмывание от криоконсерванта после размораживания.

Установлено, что в условиях быстрого замораживания-отогрева в жидком азоте (–196°C) в среде, содержащей полиэтиленгликоль (10%) или декстран (15%), а также в изоосмотической сахарозо-солевой среде выявляется большая степень повреждения эритроцитов при замораживании с высоким гематокритом (40%) по сравнению с низким гематокритом (0,8%). Данный эффект называется эффектом «упаковки», который в условиях быстрого замораживания-отогрева определяется приростом постгипертонического стресса при отогреве.

Включение в среду с полимерами диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 15% или в изоосмотическую сахарозо-солевую среду проникающих криопротекторов (глицерин, 1,2-пропандиол, ДМСО или глюкоза) в концентрации 5% устраняет эффект «упаковки» и соответственно ослабляет постгипертонический стресс. Эритроциты, отмываемые после замораживания изотоническим раствором NaCl, сохраняют нормальные осмотические и морфологические показатели.

Полученные результаты позволяют предположить, что указанный эффект при замораживании эритроцитов с непроникающими криопротекторами определяется вкладом их концентрирования в общий гипертонический градиент на клеточных мембранах при охлаждении. Это является одним из условий повышения чувствительности клеток к постгипертоническому стрессу при отогреве. Устранение данного эффекта в комбинированных средах с непроникающими и проникающими криопротекторами происходит из-за ослабления дегидратации и действия гипертонического стресса на клетки при охлаждении вследствие поступления в них проникающих криопротекторов, что является условием сохранения устойчивости эритроцитов к постгипертоническому стрессу при отогреве и отмывании криоконсерванта.

Penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-propanediol) in a concentration of 20–40% or polymer non-penetrating cryoprotectants (PEG-1500, dextran) in a concentration of 20–30% are used in the protocols of erythrocyte cryopreservation. The use of penetrating cryoprotectants in a high concentration requires the washing of erythrocytes with hypertonic NaCl solutions to prevent the development of posthypertonic hemolysis. Freezing of cells with polymers leads to the damage of membranes mainly due to hypertonic stress, which is also a cause of posthypertonic hemolysis development during thawing and washing-out the cryopreservative. The research aim was to develop a composition of the media which will ensure the preservation of the erythrocytes osmotic properties during freeze-thawing and simplify their washing from cryopreservative after thawing.

We have found that a high degree of erythrocyte damage during freeze-thawing with a high hematocrit (40%) compared with low hematocrit (0.8%) is revealed after rapid freeze-thawing in liquid nitrogen (–196°C) in the medium containing polyethylene glycol (10%) or dextran (15%) as well as in isoosmotic sucrose-saline medium. This is called ‘packing’ effect, which during rapid freeze-thawing cause the growth of posthypertonic stress during thawing.

Inclusion of dimethyl sulfoxide (DMSO) in 15% concentration into the medium with the polymers or penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-propanediol, DMSO or glucose) in 5% concentration into isoosmotic sucrose-saline medium eliminates the effect of ‘packing’ and therefore reduces posthypertonic stress. Erythrocytes washed after freezing with isotonic NaCl solution preserve normal osmotic and morphological indices.

The obtained results allow suggesting that mentioned effect during freezing of erythrocytes with non-penetrative cryoprotectants is determined by the contribution of their concentrating into a total hypertonic gradient on the cell membranes during cooling. This is one of the conditions to increase the sensitivity of cells to posthypertonic stress during thawing. Eliminating this effect in the combined media with non-penetrating and penetrating cryoprotectants occurs due to the weakening of dehydration and effect of hypertonic stress on the cells during cooling due to entering the penetrating cryoprotectants into them, which is a condition for maintaining the resistance of erythrocytes to posthypertonic stress during thawing and washing the cryopreservative.