

Оценка криозащитных свойств непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллольва при замораживании эритроцитов донорской крови человека

О.В. ВЯЗОВСКАЯ, А.В. НИКОЛЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Assessment of Cryoprotective Properties of Non-Penetrating Cryoprotectant, Oxyethylated Methyl Cellosolve, During Freezing of Human Erythrocytes

O.V. VYAZOVSKA, A.V. NIKOLENKO

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

Цель работы – исследование влияния непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллольва (ОЭМЦ) на устойчивость эритроцитов к замораживанию.

Растворы ОЭМЦ (концентрация 20 и 30%), приготовленные на 150 мМ NaCl, добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1 по объему при температуре 20–22°C. После 45-минутной экспозиции образцы замораживали в пластиковых контейнерах (2 мл) путем погружения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40–42°C. Степень сохранности эритроцитов оценивали по показателям гематокрита, гемолиза и осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl; содержание ионов K⁺ во внутриклеточной среде и надосадке определяли на пламенном фотометре ПАЖ-1.

Криозащитные среды, в основе которых используется непроникающий криопротектор, вызывают разную степень дегидратации клеток, что приводит к изменению их объема и, как следствие, увеличению количества клеток в исследуемых пробах, что отражается на результатах оценки показателя содержания внутриклеточного калия. После экспозиции эритроцитов в средах с 20 и 30% ОЭМЦ наблюдается статистически значимое повышение содержания внутриклеточного калия в опытных образцах на 14 (p < 0,04) и 19% (p = 0,05) соответственно, показатели гематокрита при этом снизились в среднем на 11 и 17% относительно контроля – эритроцитов, инкубированных в физиологическом растворе. Содержание калия в надосадке увеличилось с 1,65 ± 0,16 ммоль/л в контроле до 2,32 ± 0,22 ммоль/л (p = 0,059) после экспозиции с 20%-м раствором ОЭМЦ и до 2,95 ± 0,18 ммоль/л (p < 0,04) после экспозиции с 30%-м раствором ОЭМЦ. Выявлены достоверные отличия между этими группами (p = 0,02). Следовательно, уже на этапе экспозиции происходят определенные изменения в мембране, которые приводят к утечке калия из клетки. Содержание калия в надосадке после замораживания-отогрева эритроцитов с 20%-м раствором ОЭМЦ повысилось до 20,53 ± 1,6 и до 25,2 ± 1,9 ммоль/л после замораживания-отогрева с 30%-м раствором ОЭМЦ.

Установлено, что содержание калия в эритроцитах после замораживания-отогрева с 20 и 30%-ми растворами ОЭМЦ составляло 64 и 45% соответственно относительно значений до замораживания после экспозиции клеток со средами. Следует отметить, что существует корреляция между изменениями в содержании внутри- и внеклеточного калия до и после замораживания-отогрева в исследуемых образцах и осмотической устойчивостью криоконсервированных эритроцитов. По результатам исследуемых показателей 20%-й раствор ОЭМЦ при замораживании эритроцитов проявил более выраженное криозащитное действие по сравнению с 30%-м раствором ОЭМЦ.

The research aim was to study the effect of non-penetrating cryoprotectant, oxyethylated methyl cellosolve (OEMC), on freezing resistance of erythrocytes.

OEMC solutions (concentrations of 20 and 30%) prepared with 150 mM NaCl were added to erythrocytes in 1:1 ratio (v/v) with the rate of 1 ml/min at 20–22°C. After 45 min exposure the samples were frozen in 2 ml plastic containers by plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 40–42°C. The survival rate for erythrocytes was assessed on hematocrit indices, osmotic fragility in 0.6 and 0.9% of NaCl solutions and hemolysis; content of K⁺ ions was examined with flame photometer PAZh-1.

Cryoprotective media, based on non-penetrating cryoprotectant, cause different rate of cell dehydration, leading to their volume change and as a consequence to rise of cell number in the studied samples, that is reflected on the results of estimation of the index of intracellular potassium content. After exposure of erythrocytes in the media with 20 and 30% OEMC there is observed a statistically significant rise in the content of intracellular potassium in the experimental samples by 24% (p < 0.04) and 19% (p = 0.05), correspondingly, herewith there was found a reduction of hematocrit indices in average by 11 and 17% versus the control, the erythrocytes exposed in physiological medium. Potassium content in supernatant increased from 1.65 ± 0.16 mmol/l in the control up to 2.32 ± 0.22 mmol/l (p = 0.059) after exposure with 20% OEMC and up to 2.95 ± 0.18 mmol/l (p < 0.04) after exposure with 30% OEMC. There have been found a statistically significant differences between these groups (p = 0.02). Therefore even at the stage of exposure the certain changes in membrane, resulting in potassium release out of cell, took place. Potassium content in supernatant after freeze-thawing of erythrocytes with 20% OEMC solution increased up to 20.53 ± 1.6 mmol/l and up to 25.2 ± 1.9 mmol/l after freeze-thawing with 30% OEMC.

It has been established that potassium content in erythrocytes after freezing with 20 and 30% OEMC solutions made 64 and 45%, correspondingly, in respect of the values prior to freezing after cell exposure with the media. It should be noted that there is a correlation between the contents of intracellular potassium before and after freeze-thawing in the studied samples and osmotic resistance of the frozen-thawed erythrocytes. On the results of the studied parameters 20% OEMC solution during freezing of erythrocytes demonstrated more manifested cryoprotective effect if compared with 30% OEMC solution.