

Корреляционный анализ показателей сохранности эритроцитов до и после замораживания в криозащитных средах различного состава на основе оксиэтилированного метилцеллозолява

О.В. ВЯЗОВСКАЯ, А.В. НИКОЛЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Correlation Analysis of Erythrocyte Survival Parameters Prior to and After Freezing in Cryoprotective Media of Different Composition Based on Oxyethylated Methyl Cellosolve

O.V. VYAZOVSKA, A.V. NIKOLENKO

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

Для изучения сохранности эритроцитов при использовании криозащитных сред разного состава важна комплексная оценка функционального состояния эритроцитов, характеризующая их устойчивость к замораживанию.

Исследовали содержание ионов K^+ и Na^+ в эритроцитах, их корреляционную связь с показателями гематокрита и осмотической хрупкости в зависимости от состава криозащитных сред на основе оксиэтилированного метилцеллозолява (ОЭМЦ).

Использовали среды: 20 и 30% ОЭМЦ, приготовленные на 50 мМ и 150 мМ растворах NaCl, 20% ОЭМЦ – на 100 мМ NaCl с добавлением 3% сахарозы, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 5% глюкозой, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 5% маннитом. Эритроциты с криозащитными средами замораживали путем погружения в жидкий азот. Исследуемые образцы отогревали на водяной бане при температуре 40–42°C. Содержание внутриклеточного калия и натрия измеряли в эритроцитах до и после замораживания на пламенном фотометре ПАЖ-1. Гематокрит определяли в капиллярах с использованием микроцентрифуги МГЦ-8. Осмотическую хрупкость измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм и рассчитывали относительно 100%-го гемолиза.

Криозащитные среды на основе непроникающего криопротектора ОЭМЦ на этапе экспозиции вызывали разную степень дегидратации клеток, что отражалось на показателях гематокрита и сохранности криоконсервированных эритроцитов. Установлена положительная корреляция гематокрита с сохранностью внутриклеточного калия ($k = 0,82, p < 0,03$) и отрицательная – со значениями осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания ($k = -0,88, p < 0,01$), т. е. чем ниже показатели гематокрита после экспозиции эритроцитов с криозащитными средами, тем выше их осмотическая хрупкость и, как следствие повреждения клеточных мембран, – большая потеря клетками калия. Осмотическая хрупкость после замораживания отрицательно коррелировала с содержанием внутриклеточного калия ($k = -0,94, p = 0,001$) и положительно – с содержанием внутриклеточного натрия ($k = 0,9, p < 0,006$).

Анализ полученных результатов показал, что сохранность эритроцитов определялась составом криозащитных сред: содержанием электролита (NaCl) и неэлектролитов (криопротектора и углеводов). Снижение в криозащитных средах на основе ОЭМЦ концентрации криопротектора с 30 до 20%, содержания соли (NaCl) с 150 до 50 мМ и добавление углеводов (сахарозы, маннита, глюкозы) способствовали повышению сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева по всем исследуемым показателям.

To study the erythrocyte survival after application of cryoprotective media with different composition the integrated assessment of functional state, characterising erythrocyte resistance to freezing is important.

The content of K^+ and Na^+ in erythrocytes was studied as well as their correlation with hematocrit and osmotic fragility depending on the cryoprotective medium compositions based on oxyethylated methyl cellosolve (OEMC).

The following media were used: 20% and 30% OEMC prepared with 50 mM and 150 mM NaCl solutions, 20% OEMC in 100 mM NaCl solution supplemented with 3% sucrose, 20% OEMC in 50 mM NaCl with 5% glucose, 20% OEMC in 50 mM NaCl with 5% mannitol. Erythrocytes were frozen in the cryoprotective media by plunging into liquid nitrogen. The experimental samples were thawed in water bath at 40–42°C. The intracellular potassium and sodium content was measured in erythrocytes prior to and after freezing using a flame photometer PAG-1. Hematocrit was examined in capillaries using a microcentrifuge GCM-8. Osmotic fragility was determined by a spectrophotometric method at 540 nm and calculated vs. 100% hemolysis.

The cryoprotective media based on the non-penetrating cryoprotectant OEMC during exposure caused different rate of cell dehydration, which affected hematocrit and indices of erythrocyte survival. There were found the positive correlation of hematocrit with the intracellular potassium content ($k = 0.82, p < 0.03$) and negative correlation with the post-thaw erythrocyte osmotic fragility values ($k = -0.88, p < 0.01$); i. e. the lower was hematocrit of erythrocytes after exposure with cryoprotective media, the higher was their osmotic fragility, and, as a consequence of cell membranes damage, the higher loss of cell potassium. Osmotic fragility after freezing negatively correlated with intracellular potassium content ($k = -0.94; p = 0.001$) and positively correlated with intracellular sodium content ($k = 0.9, p < 0.006$).

Analysis of the obtained results showed that erythrocyte survival was determined by the cryoprotective media composition: content of electrolyte (NaCl) and non-electrolytes (cryoprotectant and carbohydrates). Decrease of the cryoprotectant concentration from 30% to 20% in the cryoprotective media composition based on OEMC, reduction of NaCl content from 150 mM to 50 mM and addition of carbohydrates (sucrose, mannitol, glucose) improved erythrocyte survival after freeze-thawing by all the studied parameters.