

Исследование криопротекторных и физико-химических свойств сред на основе оксиэтилированного метилцеллозоля

А.В. НИКОЛЕНКО, О.В. ВЯЗОВСКАЯ, В.В. ЧЕКАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Cryoprotective and Physicochemical Properties of Media Based on Oxyethylated Methyl Cellosolve

A.V. NIKOLENKO, O.V. VYAZOVSKAYA, V.V. CHEKANOVA

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

Проведено комплексное исследование криопротекторных и физико-химических свойств композиционных сред на основе оксиэтилированного метилцеллозоля (ОЭМЦ). В качестве криозащитных сред использовали 20 и 30% ОЭМЦ, приготовленные на 50 и 150 мМ растворах NaCl, 20% ОЭМЦ – на 100 мМ NaCl с добавлением 90 мМ сахарозы, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 200 мМ глюкозой, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 200 мМ маннитом. Криопротекторные свойства сред оценивались по комплексу показателей, характеризующих сохранность эритроцитов: гемолизу, осмотической хрупкости, внутриклеточному содержанию калия и натрия. Определяли физико-химические свойства сред: осмотичность, ионную силу, динамическую вязкость, поверхностное натяжение, плотность, температуру заморозки.

Установлено, что сохранность криоконсервированных эритроцитов зависит от состава криозащитных сред и их физико-химических свойств. Введение углеводов в криозащитные среды на основе 20% ОЭМЦ приводит к повышению показателей плотности, вязкости, поверхностного натяжения относительно показателей, полученных для среды с 20% ОЭМЦ на 50 мМ NaCl. При этом температура заморозки сред меняется от $-2,80$ до $-4,30^{\circ}\text{C}$. В присутствии углеводов при использовании сред с 20%-й концентрацией ОЭМЦ наблюдается наиболее высокая сохранность эритроцитов по показателям осмотической хрупкости, внутриклеточному содержанию калия и натрия и составляет в среднем 85%. С увеличением концентрации ОЭМЦ с 20 до 30% в присутствии 150 мМ NaCl на фоне повышения вязкости, плотности и понижения температуры заморозки среды наблюдается уменьшение величины поверхностного натяжения. Снижение поверхностного натяжения может приводить к менее выраженному контакту среды с клетками и, как следствие, уменьшению ее криозащитного действия. На фоне 1–1,5%-го гемолиза эритроцитов после замораживания с 30% ОЭМЦ на 150 мМ NaCl отмечаются самые высокие значения осмотической хрупкости, в среднем 45%. Эритроциты после замораживания с криозащитными средами на основе 20% концентрации ОЭМЦ в 1,5–2 раза более устойчивы к осмотическому шоку, чем клетки после замораживания с 30%-й концентрацией ОЭМЦ. При этом снижение содержания соли ниже физиологического уровня в средах с 20 и 30% ОЭМЦ повышает криоустойчивость эритроцитов, что может быть обусловлено точностью и ионной силой используемых криозащитных сред.

Выявлено многофакторное влияние исследованных физико-химических свойств криозащитных сред на структурно-функциональное состояние эритроцитов до и после замораживания. При разработке композиционных криозащитных сред необходимо учитывать концентрационное соотношение компонентов среды (электролит/неэлектролит) и их физико-химические свойства. Присутствие углеводов в композиционных средах в определенных соотношениях с NaCl повышает эффективность криоконсервирования эритроцитов.

Investigation of cryoprotective and physicochemical properties of compositional media at the base of oxyethylated methyl cellosolve (OEMC) has been performed. As the cryoprotective media we used 20 and 30% OEMC prepared on the base of 50 and 150 mM solutions of NaCl, 20% OEMC on 100 mM NaCl supplemented with 90 mM sucrose, 20% OEMC on 50 mM NaCl with 200 mM glucose, 20% OEMC on 50 mM NaCl with 200 mM mannitol. Cryoprotective properties of the media were evaluated by the complex of indices characterizing erythrocyte survival: hemolysis, osmotic fragility, intracellular content of potassium and sodium. We determined physicochemical properties of the media: osmotic density, ionic strength, viscosity, surface strain, density, freezing temperature.

We have established that cryopreserved erythrocyte survival depends on the content of cryoprotective media and their physicochemical properties. Introduction of carbohydrates in cryoprotective media based on 20% OEMC induces increasing the indices of density, viscosity, surface strain in relation to the indices obtained for medium based on 20% OEMC with 50 mM NaCl. Moreover freezing temperature of the media changes from $-2,80^{\circ}\text{C}$ down to $-4,30^{\circ}\text{C}$. In the presence of carbohydrates using the media with 20% OEMC we observed the highest erythrocyte survival by the indices of osmotic fragility and intracellular content of potassium and sodium and it made 85% at average. Increasing OEMC concentration from 20 up to 30% in the presence of 150 mM NaCl on the background of increasing viscosity, density and decreasing freezing temperature of the medium we noted decreasing surface strain. Decreasing surface strain may lead to less expressed contact of the medium with cells and consequently decrease of their cryoprotective effect. The highest indices of osmotic fragility (45% in average) are noted on the background of 1–1.5% erythrocyte hemolysis after freezing with 30% OEMC with 150 mM NaCl. Erythrocytes after freezing with cryoprotective media based on 20% OEMC are by half or twice more resistant to the osmotic shock than the cells after freezing with 30% OEMC. Furthermore the decrease of saline content lower than physiological level in media with 20 and 30% OEMC increases erythrocyte cryoresistance that may be stipulated by tonicity and ionic strength of the used cryoprotective media.

We revealed multi-factor effect of the studied physicochemical properties of cryoprotective media on structure-functional state of erythrocytes prior to and after freezing. When developing the compositional cryoprotective media one should consider the concentration ratio of media components (electrolyte/non-electrolyte) and their physicochemical properties. The presence of carbohydrates in compositional media in certain ratios with NaCl rises the efficiency of erythrocyte cryopreservation.