

Кріозахисна дія оксиетильованого гліцерину зі ступенем полімеризації $n=30$ при заморожуванні еритроцитів людини

UDC 615.361.018.51.014.41:547.426

Yu.S. ESIPOVA, O.V. NIKOLENKO, A.M. KOMPANIETS*

Cryoprotective Effect of Oxyethylated Glycerol with $n=30$ Polymerisation Degree Under Human Erythrocyte Freezing

При розробці сучасних методів кріоконсервування еритроцитів з використанням наднизьких температур важливим етапом є пошук кріозахисних сполук, які максимально запобігають загибелі клітин при заморожуванні і не потребують видалення перед трансфузією [1, 3].

Мета роботи – дослідження кріозахисної дії оксиетильованого гліцерину зі ступенем полімеризації $n=30$ (ОЕГ _{$n=30$}) при заморожуванні еритроцитів людини.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були еритроцити, отримані з донорської крові людини, заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир». Вони зберігалися після ексфузії не більше 2-х діб при 4°C.

Розчини ОЕГ _{$n=30$} готували на 0,15 М розчині NaCl у концентраціях 20, 30 і 40% і з'єднували з еритроцитами 1:1 за об'ємом.

Вивчали вплив на результати кріоконсервування різних концентрацій ОЕГ _{$n=30$} , тривалості експозиції клітин з кріозахисними розчинами (15, 30 і 60 хв), а також температури введення кріозахисного розчину ОЕГ _{$n=30$} : 37, 20, 2°C.

При заморожуванні еритроцитів були досліджені кріозахисні середовища, основу яких складав ОЕГ _{$n=30$} в концентрації 30% в комбінаціях з 5%-ю глюкозою, 5%-м манітолом, 3%-ю сахарозою, 2%-м цитратом натрію.

Для контролю використовували 30%-й розчин ОЕГ _{$n=30$} , який готували на 0,15 М розчині NaCl.

Заморожування здійснювали у металевих контейнерах ємністю 2 мл шляхом занурення їх у рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 40°C.

Ступінь схоронності еритроцитів оцінювали за наступними показниками: гематокрит, осмотична крихкість у 0,6 і 0,9% розчинах NaCl [2], відсоток гемолізу, морфологія клітин.

When designing the current methods for erythrocyte cryopreservation using ultralow temperatures the important stage is to search for cryoprotective compounds, maximally preventing cell death under freezing-thawing and not requiring removal before transfusion [1, 3].

The research was aimed to study a cryoprotective effect of oxyethylated glycerol with $n=30$ polymerisation degree (OEG _{$n=30$}) under human erythrocyte freezing.

Materials and methods

Erythrocytes, procured from human donor blood, prepared with "Glygicir" hemopreservative served as the research object. After exfusion they were stored no longer than 2 days at 4°C.

The OEG _{$n=30$} solutions were prepared with 0.15 M NaCl one in 20, 30 and 40% concentrations and combined with erythrocytes of 1:1 volume.

There was studied the effect of differently concentrated OEG _{$n=30$} , cell exposure duration with cryoprotective media (15, 30 and 60 min), as well as introduction temperatures of OEG _{$n=30$} cryoprotective solutions: 37, 20, 2°C on cryopreservation outcome.

During erythrocyte freezing we have studied the cryoprotective media, based on OEG _{$n=30$} in 30% concentration combined with 5% glucose, 5% mannitol, 3% sucrose, 2% sodium citrate.

A 30% OEG _{$n=30$} solution, prepared with 0.15 M NaCl was used as the control.

Freezing was carried-out in 2 ml metal containers by immersing into liquid nitrogen. Samples were thawed on water bath at 40°C.

Erythrocyte preservation degree was estimated by the following indices: hematocrit, osmotic fragility in 0.6 and 0.9% NaCl solutions [2], hemolysis percentage, cell morphology.

Results were statistically processed using the Student-Fisher method ($M \pm m, n=7$).

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Статистичну обробку результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера ($M \pm m$, $n=7$).

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень вивчали вплив кріозахисних розчинів $OEG_{n=30}$ на схоронність еритроцитів людини до заморожування. Показано, що після 60 хв експозиції еритроцитів у кріозахисному розчині 20 і 30% концентрації $OEG_{n=30}$ показники осмотичної крихкості і гемолізу залишались на рівні контролю, тобто показників інтактних еритроцитів (0–0,02%). При дослідженні клітин у світловому мікроскопі виявлена переважна більшість дискоїдних форм. Збільшення концентрації $OEG_{n=30}$ до 40% у кріозахисному розчині призводить до підвищення рівня гемолізу (2–3%) після перенесення еритроцитів у 0,6% розчин NaCl. При дослідженні клітин у світловому мікроскопі після експозиції в 40%-му кріозахисному розчині $OEG_{n=30}$ виявлена значна кількість агрегатів.

На наступному етапі вивчено вплив таких факторів, як концентрація кріопротектора, температура введення та час експозиції, на показники схоронності еритроцитів після кріоконсервування.

При дослідженні впливу різних концентрацій $OEG_{n=30}$ на схоронність еритроцитів після заморожування-відігрівання найкращі показники отримано при використанні 30%-ї концентрації $OEG_{n=30}$ (рис. 1). Менш ефективним виявився кріозахисний розчин, який містить 20%-й $OEG_{n=30}$, на це вказує підвищення осмотичної крихкості і рівня гемолізу в суспензії розморожених еритроцитів. Встановлено, що збільшення концентрації кріопротектора до 40% значно знижує схоронність еритроцитів за показниками осмотичної крихкості і гемолізу (рис. 1). Для подальших досліджень обрано кріозахисний розчин, який містить 30% концентрацію $OEG_{n=30}$.

При вивченні різних режимів обробки клітин непроникаючим кріопротектором $OEG_{n=30}$ встановлено значення впливу температурного фактора і тривалості експозиції на рівень схоронності еритроцитів. Як свідчать дані таблиці, максимальні показники схоронності клітин за результатами осмотичної крихкості після перенесення у 0,9% розчин NaCl отримано при температурі введення кріопротектора у суспензію еритроцитів 37 або 2°C. Тим часом впливу температури введення кріопротектора на рівень гемолізу та показник гематокриту не виявлено.

Дослідження впливу тривалості експозиції еритроцитів з $OEG_{n=30}$ в інтервалі 15, 30, 60 хв при кімнатній температурі на показники схоронності кріоконсервованих еритроцитів свідчать про відсутність цього впливу на показники гемолізу та гематокриту. Відмічена тенденція до зниження осмотичної крихкості еритроцитів після кріоконсервування при температурі введення кріопротектора

Results and discussion

At the first stage we studied the effect of $OEG_{n=30}$ cryoprotective solutions on human erythrocyte preservation prior to freezing. After 60 min erythrocyte exposure in cryoprotective solution of 20 and 30% $OEG_{n=30}$ concentrations the indices of osmotic fragility and hemolysis were shown as remaining at the control level, i.e. at that for intact erythrocytes (0–0.02%). When studying cells under light microscopy the most of discoid forms was revealed. An increase in $OEG_{n=30}$ concentration up to 40% in a cryoprotective solution results in the enhancement of hemolysis level (2–3%) after erythrocyte transfer into 0.6% NaCl solution. During cell study under light microscopy after exposure in 40% $OEG_{n=30}$ cryoprotective solution a great number of aggregates was revealed. At the following stage there was studied the effect of such factors, as cryoprotectant concentration, introduction temperature and exposure time on the indices of erythrocyte integrity after cryopreservation.

When studying the influence of different $OEG_{n=30}$ concentrations on erythrocyte integrity after freeze-thawing the highest indices were obtained when using 30% $OEG_{n=30}$ concentrations (Fig. 1). The less efficient was cryoprotective solution, containing 20% $OEG_{n=30}$, as indicated by augmentation of osmotic fragility and hemolysis level in frozen-thawed erythrocyte suspension. An increase in cryoprotectant concentration up to 40% was established as significantly reducing the erythrocyte integrity according to the indices of osmotic fragility and hemolysis (Fig. 1). For further researches we selected a cryoprotective solution, containing 30% $OEG_{n=30}$ concentration.

When studying different regimens of cell treatment with $OEG_{n=30}$ non-penetrating cryoprotectant the importance of temperature factor and exposure duration influence on erythrocyte integrity level was established. As detailed in the Table, the maximum indices of cell integrity by the results of osmotic fragility after transferring into 0.9% NaCl solution were obtained either at 37 or 2°C temperature of cryoprotectant introduction into erythrocyte suspension. Meanwhile no effect of cryoprotectant introduction temperature on hemolysis level and hematocrit index was revealed.

Investigations of the effect of erythrocyte exposure duration with $OEG_{n=30}$ within 15, 30, 60 min range at room temperature on the indices of cryopreserved erythrocyte integrity testify to the absence of such influence on hemolysis and hematocrit indices. The tendency to a decrease in erythrocyte osmotic fragility after cryopreservation either at 2 or 20°C temperature of cryoprotectant introduction and cell exposure in cryoprotective solution for 60 min, was noted. Augmentation of exposure time at 37°C cryoprotectant introduction temperature negatively affects the level of erythrocyte integrity after freeze-thawing (Table).

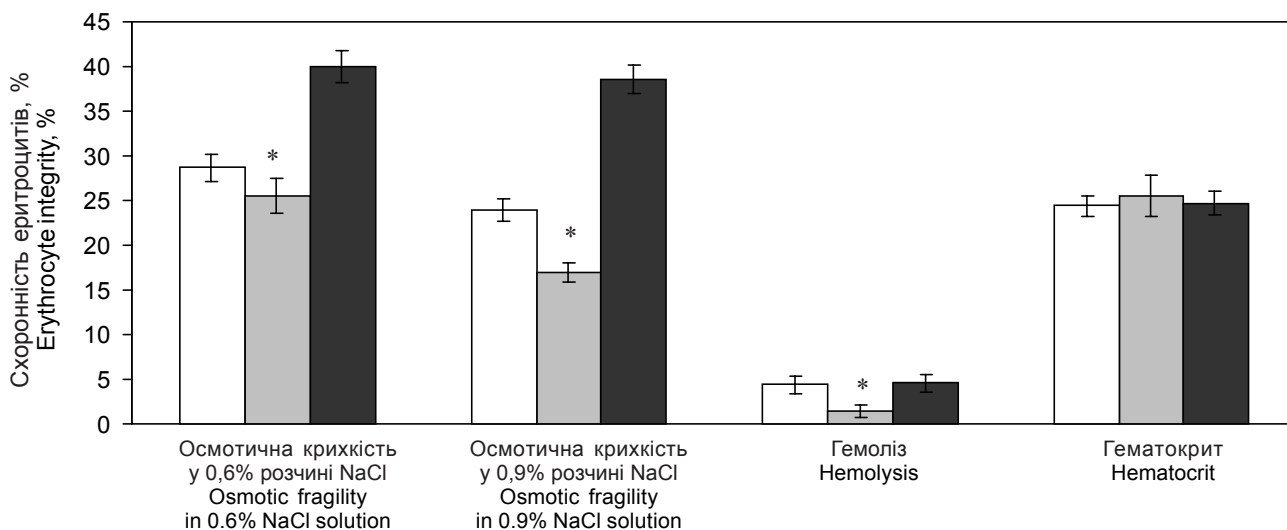


Рис. 1. Вплив різних концентрацій ОЕГ_{n=30} на показники схоронності еритроцитів людини після криоконсервування, %: □ – 20; ■ – 30; ■ – 40; * – p < 0,05 розбіжності вірогідні у порівнянні з 20 і 40% концентрацією криопротектора.

Fig. 1. Effect of different concentrations of OEG_{n=30} on indices of human erythrocyte integrity after cryopreservation, %: □ – 20; ■ – 30; ■ – 40; * – p < 0.05, statistically significant differences compared to the data of 20 and 40% cryoprotectant concentrations.

2 або 20°C і експозиції клітин в криозахисному розчині на протязі 60 хв. Збільшення часу експозиції при температурі введення криопротектора 37°C негативно впливає на рівень схоронності еритроцитів після заморожування-відігрівання (таблиця).

Дослідження криозахисних розчинів, які містять 30% концентрацію ОЕГ_{n=30} в комбінації з 5%-ю глюкозою, 5%-м манітом, 3%-ю сахарозою і 2%-м цитратом натрію, показали, що введення глюкози і цитрату натрію підвищує осмотичну крихкість і рівень гемолізу еритроцитів після заморожування-відігрівання. При використанні комбінації 3%-ї сахарози і 30%-го ОЕГ_{n=30} відмічено зменшення осмотичної крихкості в порівнянні зі зразками, які не містять сахарози. Маніт, який вводили у 30%-й розчин ОЕГ_{n=30}, також сприяв підвищенню криозахисної ефективності криопротектора, забезпечуючи високу осмотичну стійкість і низький рівень гемолізу криоконсервованих еритроцитів (рис. 2).

Studying the cryoprotective solutions, containing 30% OEG_{n=30}, combined with 5% glucose, 5% mannitol, 3% sucrose and 2% sodium citrate demonstrated that glucose and sodium citrate introduction increased an osmotic fragility and erythrocyte hemolysis level after freeze-thawing. When using combination of 3% sucrose and 30% OEG_{n=30} a reduction of osmotic fragility compared to the sucrose-free samples was noted. Mannitol, introduced in 30% OEG_{n=30} solution

Показники схоронності еритроцитів в залежності від умов обробки криопротектором ОЕГ_{n=30} після заморожування-відігрівання
Indices of erythrocyte integrity depending on treatment conditions with OEG_{n=30} cryoprotectant after freeze-thawing

Температура введення, °C Introduction temperature, °C	Експозиція еритроцитів, хв Erythrocyte exposure, min	Осмотична крихкість, % Osmotic fragility, %		Гемоліз, % Hemolysis, %	Гематокрит, % Hematocrit, %
		NaCl 0,6%	NaCl 0,9%		
37	15	21,0±0,5*	13,7±0,5*	1,3±0,1	25,8±0,6
	30	27,2±0,5	14,5±0,2	2,7±0,2	25,6±0,6
	60	31,7±0,5	16,8±0,1	3,2±0,2	25±0,5
20	15	25,5±0,7	19,7±0,5*	1,4±0,2	25,6±0,2
	30	24,6±0,1	16,7±0,7	1,2±0,1	26±0,5
	60	20,6±0,5	15,6±0,7	1,1±0,3	27,5±0,1
2	15	23,8±0,5	18,5±2*	1,5±0,4	26,1±0,5
	30	21,4±0,5	14±1,1	1,2±0,4	26,2±0,5
	60	20,7±0,2	13,4±0,5	1±0,4	27,4±1,4

* – p < 0,05 розбіжності вірогідні у порівнянні з часом експозиції 60 хв.

* is p < 0.05 difference is statistically significant compared to 60 min exposure.

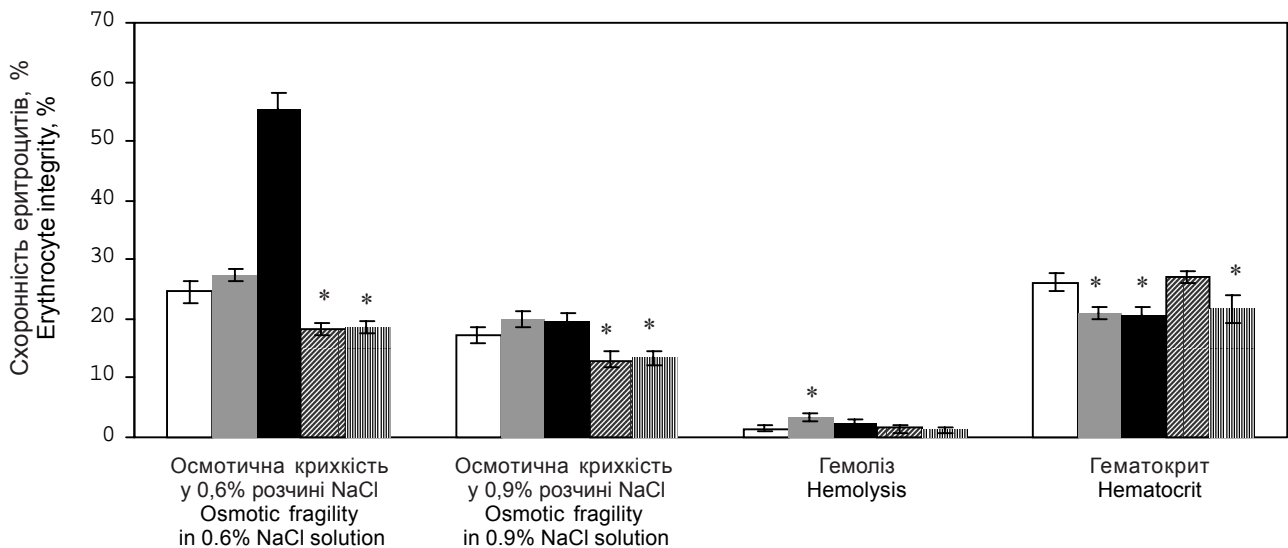


Рис. 2. Показники схоронності еритроцитів після кріоконсервування в кріозахисних середовищах на основі ОЕГ_{n=30}: □ – ОЕГ_{n=30} + 0,15 М розчин NaCl; ▒ – ОЕГ_{n=30} + 0,2% цитрат натрію; ■ – ОЕГ_{n=30} + 5% глюкоза; ▨ – ОЕГ_{n=30} + 3% сахароза; ▩ – ОЕГ_{n=30} + 5% маніт; * – $p < 0,05$ розбіжності вірогідні у порівнянні з відповідними показниками схоронності еритроцитів при заморожуванні в середовищі з 30% концентрацією ОЕГ_{n=30} + 0,15 М NaCl.

Fig. 2. Indices of erythrocyte integrity after cryopreservation in OEG_{n=30}-based cryoprotective media: □ – is OEG_{n=30} + 0.15 M NaCl solution; ▒ – is OEG_{n=30} + 0.2% sodium citrate; ■ – is OEG_{n=30} + 5% glucose; ▨ – is OEG_{n=30} + 3% sucrose; ▩ – is OEG_{n=30} + 5% mannitol; * – $p < 0.05$, statistically significant differences compared to the corresponding indices of erythrocyte integrity under freezing in the media with 30% OEG_{n=30} + 0.15 M NaCl.

Висновки

Використання розчинів ОЕГ_{n=30} при заморожуванні еритроцитів дозволяє отримати високий рівень життєздатних клітин після заморожування-відігрівання, при цьому ефективність їх кріозахисної дії залежить від концентрації, часу експозиції, температури еквілібрації клітин з кріопротектором, а також від складу кріозахисного середовища.

Високі показники схоронності еритроцитів після кріоконсервування отримано при використанні непроникаючого кріопротектора в концентрації 30%. Тривалість експозиції при температурі введення кріозахисного розчину 37°C має бути 15 хв, а при 2 і 20°C – 60 хв.

Кріозахисні середовища на основі ОЕГ_{n=30}, які містять 3% сахарозу або 5% маніт, підвищують показники схоронності еритроцитів після низькотемпературного консервування.

Таким чином, перспективним напрямком подальших досліджень при заморожуванні еритроцитів є створення і дослідження композиційних багатокомпонентних кріозахисних середовищ на основі ОЕГ_{n=30}.

Література

1. Компаниец А.М., Николенко А.В., Чеканова В.В., Троц Ю.П. Кріоконсервирование эритроцитов под защитой олигомера оксиэтилированного глицерина (n=25)// Пробл.криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 561–565.
2. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике.– М., 1987.– С. 115–119.

also contributed to an increase in cryoprotective efficiency of cryoprotectant by providing a high osmotic resistance and low hemolysis level in cryopreserved erythrocytes (Fig. 2).

Conclusions

Application of OEG_{n=30} solutions during erythrocyte freezing enables to obtain a high level of viable cells after freeze-thawing, at the same time the efficiency of their cryoprotective action depends on concentration, exposure time, cell equilibration temperature with cryoprotectant, as well as cryoprotective medium composition.

High indices of erythrocyte integrity after cryopreservation were obtained when using a non-penetrating cryoprotectant in 30% concentration. Exposure duration at 37°C temperature of cryoprotective medium introduction should be 15 min but 60 min at 2 and 20°C.

OEG_{n=30}-based cryoprotective media, containing either 3% sucrose or 5% mannitol, augment the indices for erythrocyte integrity after low temperature preservation.

Thus, designing and studying the OEG_{n=30}-based compositional multicomponent cryoprotective media are the perspective directions for further research in erythrocyte freezing.

References

1. Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Chekanova V.V., Trots Yu.P. Erythrocyte cryopreservation under oxyethylated glycerol

3. *Шраго М.И., Калугин Ю.В., Кочуровская Г.Г.* Влияние оксиэтилирования на некоторые физико-химические и биологические характеристики глицерина // Криобиология и криомедицина.– 1976.– Вып. 2.– С. 31–33.

Надійшла 13.05.2008

- oligomer (n=25) protection // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 561–565.
2. *Menshikov V.V.* Laboratory research methods in clinic.– Moscow, 1987.– P. 115–119.
3. *Shrago M.I., Kalugin Yu.V., Kochurovskaya G.G.* Effect of oxyethylation on some physical, chemical and biological characteristics of glycerol // Kriobiologiya i Kriomedsina.– 1976.– Issue 2.– P. 31–33.

Accepted in 13.05.2008