

Постгипертонический лизис эритроцитов в комбинированных средах

Е.А. Чабаненко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Posthypertonic Lysis of Red Blood Cells in Combined Media

O.O. Chabanenko, N.V. Orlova, N.M. Shpakova

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

Метод низкотемпературного консервирования эритроцитов под защитой глицерина используют с целью продолжительного их хранения. При размораживании эритроцитов на них действуют криоповреждающие факторы – изменение концентрации соли и криопротектора (глицерина). Для оценки влияния этих факторов на клетки используют модель постгипертонического шока (ПГШ), при котором клетки после инкубирования в среде дегидратации переносят в среду регидратации.

Цель работы – исследование постгипертонического лизиса эритроцитов человека при варьировании концентраций соли (NaCl) и криопротектора (глицерин) в условиях неизменной осмоляльности среды дегидратации при 37 и 0°C.

Постгипертонический шок осуществляли инкубированием эритроцитов в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl (этап 1, 20 мин), с последующим перенесением в 0,15 моль/л NaCl (этап 2, 5 мин). Уровень гемолиза эритроцитов определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. На этапе 1 ПГШ использовали комбинированные среды, содержащие глицерин (2–15%) и хлорид натрия в различных соотношениях при условии сохранения суммарной осмоляльности раствора на уровне 2370 мОсм/л. Дегидратацию клеток (этап 1) проводили при температуре 37°C, а регидратацию (этап 2) – при 37 и 0°C.

Установлено, что при 37°C уровень постгипертонического лизиса (ПГЛ) эритроцитов, перенесенных из 1,2 в 0,15 моль/л NaCl, составляет примерно 10%. Глицерин (2–10%) в составе комбинированных сред практически не вызывает изменения уровня ПГЛ эритроцитов, а при повышении концентрации глицерина до 15% резко увеличивается гемолиз клеток. Показано, что перенос клеток из среды дегидратации (1,2 моль/л NaCl, 37°C) в среду регидратации (0,15 моль/л NaCl, 0°C) сопровождается 80%-м гемолизом эритроцитов. Глицерин в концентрации 2–7% вызывает 4-кратное снижение ПГЛ эритроцитов, а в концентрациях 10–15% – повышение гемолиза клеток от 65 до 100%.

В том случае, когда на этапе 1 ПГШ использовали растворы глицерина, приготовленные на 0,15 моль/л NaCl, характер изменения ПГЛ эритроцитов не зависел от температуры этапа 2: резкое увеличение уровня ПГЛ клеток при концентрациях криопротектора, превышающих 2%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень ПГЛ эритроцитов не зависит от общей осмоляльности среды дегидратации, а определяется концентрацией глицерина. Таким образом, исходя из того, что уровень ПГЛ эритроцитов значительно ниже в комбинированных средах, можно предположить, что присутствие в среде солевого компонента (выше физиологического уровня) влияет на проницаемость эритроцитарных мембран для глицерина.

The method of red blood cells (RBC) cryopreservation under protection of glycerol is used for the purpose of prolonged storage of cells. During thawing of RBC, they are affected by cryodamage factors, which include the changes in concentration of salt and cryoprotectant agent (CPA), glycerol. To assess the effect of these factors on cells, posthypertonic shock (PHS) model is used, wherein the cells, after incubation in dehydration medium, are transferred to the rehydration one.

The research aim was to study the posthypertonic lysis of human red blood cells by varying the concentrations of salt (NaCl) and cryoprotectant (glycerol) under the conditions of constant osmolality of dehydration medium at 37 and 0°C.

Posthypertonic shock was performed by incubating the erythrocytes in a medium containing 1.2 mol/L NaCl (stage 1, 20 min), followed by transferring to 0.15 mol/L NaCl (stage 2, 5 min). The level of hemolysis of RBC was determined spectrophotometrically at a wavelength of 543 nm. At stage 1 of PHS, the combined media containing CPA (2–15%) and sodium chloride in various ratios were used, if the total osmolality of the solution was kept at the level of 2,370 mOsm/L. The cells (stage 1) were dehydrated at 37°C, and the rehydration (stage 2) was done at 37 and 0°C.

It was established that at 37°C, the level of posthypertonic lysis (PHL) of RBC transferred from 1.2 mol/L to 0.15 mol/L NaCl was about 10%. CPA (2–10%) in the composition of combined media practically did not cause the changes in PHL of RBC, while increasing the concentration of glycerol up to 15% led to a sharp increase in cell hemolysis. It was shown that transfer cells from dehydration medium (1.2 mol/L NaCl, 37°C) to the rehydration one (0.15 mol/L NaCl, 0°C) was accompanied by 80% hemolysis of RBC. CPA in concentrations of 2–7% caused a 4-fold decrease in PHL of RBC, and in concentrations of 10–15% it led to an increase of cell hemolysis from 65 to 100%.

In case when CPA was prepared with 0.15 mol/L NaCl and used at the PHS stage 1, the character of changes the RBC PHL did not depend on temperature of the 2 stage: sharp increase in PHL of cells was observed at CPA concentrations exceeding 2%.

The obtained data indicate that the level of PHL of RBC did not depend on total osmolality of dehydration medium, but was determined by CPA concentration. Thus, based on the fact that PHL of RBC was significantly lower in the combined media, it could be assumed that the presence of a salt component in medium (over physiological level) affected the permeability of RBC membranes for glycerol.

