

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В КОМБИНИРОВАННОЙ СРЕДЕ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

*В. В. Рамазанов
Т. И. Дейнеко
Е. Л. Воловельская
В. А. Коптелов
В. А. Бондаренко*

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Получено 27.05.2011

Исследовали осмотические, антиоксидантные и морфологические характеристики эритроцитов, замороженных в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) в среде, содержащей полиэтиленгликоль-1500, или в комбинированной среде с полиэтиленгликолем-1500 и диметилсульфоксидом. При замораживании в среде, содержащей полиэтиленгликоль-1500, отмечается значительная степень повреждения эритроцитов (55–60%), потеря клетками глутатиона при отмывании криоконсерванта и повышение проницаемости оставшейся части клеток для ионов H^+ . В то же время не выявлено существенного увеличения концентрации малонового диальдегида и значительного изменения показателей активности глутатионзависимых энзимов (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы) при замораживании в двух указанных средах. При дополнительном включении в среду диметилсульфоксида степень повреждения эритроцитов во время замораживания снижается (7–9%) с сохранением осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта. Полученные результаты позволяют предположить, что сохранение осмотических и морфологических свойств эритроцитов, замороженных в комбинированной среде с полиэтиленгликолем-1500 и диметилсульфоксидом, обеспечивается проникновением последнего в клетки и ослаблением гипертонического стресса, обусловленного концентрированием NaCl и ПЭГ-1500 при замораживании.

Ключевые слова: эритроциты, осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства, замораживание, комбинированный криоконсервант.

Окисление гемоглобина в метгемоглобин происходит с образованием супероксидного радикала при последующей его нейтрализации супероксиддисмутазой с образованием пероксида водорода, утилизация которого осуществляется каталазой и глутатионпероксидазой [1]. Недостаток глутатиона в эритроцитах приводит к снижению активности глутатионпероксидазы, повышению концентрации пероксида водорода, образованию гидропероксидов жирных кислот и повреждению мембран [1, 2]. Некоторые исследователи предполагают, что рост осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания и хранения при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ определяется индукцией пероксидного окисления липидов (ПОЛ) мембран вследствие окисления гемоглобина в метгемоглобин [3]. При этом с увеличением срока хранения образцов от 1 до 6 мес отмечается корреляция

между ростом концентрации малонового диальдегида (МДА) и повышением осмотической хрупкости эритроцитов [3].

Эритроциты, замороженные в среде без криопротектора, в значительной степени повреждены, а оставшаяся часть клеток (1–2%) морфологически представлена сфероцитами и сфероэритроцитами с миелоидными везикулами, от которых отделяются везикулы. Включение в среду замораживания декстрана обеспечивает предотвращение везикуляции и заметного гемолиза эритроцитов, при этом оставшиеся клетки морфологически представлены в основном дискоцитами с невысоким содержанием эхиноцитов [4]. Однако такие морфологические показатели характерны для клеток, которые не отмывались от декстрана после замораживания. Эритроциты, замороженные в среде с декстраном (30%) или гли-

церолом (35%) и отмытые от криоконсерванта изотоническим раствором NaCl (0,9%), являются осмотически хрупкими по сравнению с интактными клетками [4]. Использование глицерола в высокой концентрации требует специальных подходов для его отмывания с использованием ряда гипертонических растворов с целью сохранения осмотических свойств эритроцитов [5].

Криоконсервирование эритроцитов с полимерными непроницающими криопротекторами может исключать процедуру их отмывания, однако после трансфузии клеток с такими криопротекторами выявляются лейкоцитоз, повышение концентрации гемоглобина и билирубина в плазме, а также отмечается задержка выведения криопротекторов из организма [6]. Для устранения таких проблем необходимо снизить концентрацию полимерных криопротекторов или отмывать их перед трансфузией [7]. Однако эритроциты, замороженные с полимерными криопротекторами, осмотически неустойчивы [4, 6].

В связи с вышеизложенным возникает задача разработки криоконсервантов, которые будут не только обеспечивать сохранение осмотических свойств эритроцитов при замораживании, но и упрощать их отмывание от криоконсерванта после размораживания.

Известно, что если среда, в которой находятся эритроциты, содержит не более 6% глицерола, то последующее перенесение клеток в изотонический раствор NaCl не вызывает нарушения осмотической устойчивости клеток [8]. Эти данные указывают на то, что криоконсервант должен содержать невысокую концентрацию проникающего криопротектора, для того чтобы при отмывании эритроцитов изотоническим раствором NaCl получить осмотически нормальные клетки. Для диметилсульфоксида (ДМСО) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) такая концентрация может быть выше, поскольку их проницаемость для мембран эритроцитов на порядок выше, чем у глицерола [9]. Использование комбинированного криоконсерванта, содержащего поливинилпирролидон (15%) и ДМСО (25%), позволяет упростить способ отмывания эритроцитов после замораживания и отмывать их только двумя циклами вместо четырех, используемых после замораживания-оттаивания эритроцитов в среде с глицеролом [10].

Установлено, что сочетание в криоконсерванте декстрана или ПЭГ-1500 с ДМСО (15%) приводит к устранению так называемого эффекта «упаковки» [11] — проявление

более высокой степени повреждения эритроцитов при замораживании-оттаивании с высоким гематокритом по сравнению с низким [12]. При быстром замораживании-оттаивании эффект «упаковки» определяется в основном приростом постгипертонического стресса на клетки при размораживании [13]. В связи с этим устранение эффекта «упаковки» служит показателем ослабления действия постгипертонического стресса и, следовательно, размороженные эритроциты могут быть более осмотически устойчивыми при процедуре отмывания криоконсерванта, что даст возможность упростить способ их отмывания, исключив гипертонические растворы. Степень постгипертонического повреждения эритроцитов существенно зависит от температуры среды для ресуспендирования: при 35–37 °С клетки проявляют наибольшую устойчивость к данному повреждающему фактору [14].

Таким образом, для отмывания эритроцитов после размораживания одним изотоническим раствором NaCl без использования гипертонических растворов криоконсервант должен содержать невысокие концентрации проникающих криопротекторов. При этом отмывание необходимо производить при 35–37 °С, а защитная среда должна устранять один из основных факторов повреждения эритроцитов при замораживании с высоким гематокритом — эффект «упаковки», с тем чтобы ослабить повреждающее действие постгипертонического стресса при размораживании.

Цель работы — определить осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства эритроцитов, отмытых изотоническим раствором NaCl после замораживания в комбинированной среде с ПЭГ-1500 и ДМСО.

Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х. ч.), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) производства Merck (Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) производства Sigma (США). Среды замораживания готовили на изотоническом растворе NaCl (0,9%). Криоконсерванты содержали ПЭГ-1500 (20%) или ПЭГ-1500 (20%) в комбинации с ДМСО (15%).

Эритроциты человека получали из крови 2-й группы от доноров мужского пола после четырехкратного отмывания их изотоническим раствором NaCl. Металлические контейнеры объемом 10 мл с образцами эритроцитов в средах замораживания с гематокритом

40% инкубировали 30 мин при 25 °С, затем погружали в жидкий азот (-196 °С) на 30 мин либо на 35 месяцев. Замороженные образцы эритроцитов размораживали на водяной бане при 40 °С в течение 3 мин. Затем к 1 мл размороженной клеточной суспензии при перемешивании медленно добавляли 9 мл теплого (37 °С) изотонического раствора NaCl в течение не менее 30 с (скорость добавления — не более 0,3 мл/с). Суспензию центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Процедуру разведения и центрифугирования повторяли еще один раз. После этого эритроциты трижды отмывали теплым (37 °С) изотоническим раствором NaCl, не учитывая при этом скорость разведения осадка эритроцитов.

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 ммоль/л трис-буфера (рН 7,4) и NaCl с различной концентрацией (0,09–0,9%). Клетки в среде объемом 1 мл с гематокритом 0,6% инкубировали в течение 15 мин при 25 °С, далее центрифугировали при 3 000 об/мин 3 мин с последующим измерением степени гемолиза в надосадочной жидкости.

Степень гемолиза эритроцитов вычисляли после спектрофотометрического определения количества гемоглобина, измеряя поглощение в супернатанте образцов при длине волны 543 нм [15]:

$$\text{степень гемолиза (\%)} = [A_1/A_2] \times 100\%,$$

где A_1 — поглощение супернатанта экспериментального образца;

A_2 — поглощение при полном гемолизе контрольного образца.

Проницаемость эритроцитов для ионов H^+ исследовали в изотонической сульфатной среде в термостатируемой (37 °С) ячейке с рН-электродом [16].

Содержание глутатиона в эритроцитах определяли спектрофотометрически с использованием дитиобиснитробензойной кислоты при длине волны 412 нм [17].

Определение МДА производили спектрофотометрически при длине волны 535 нм, используя тиобарбитуровую кислоту согласно методу [18].

Активность глутатионпероксидазы оценивали по методу [19] с использованием дитиобиснитробензойной кислоты, активность глутатионредуктазы — с применением метода [20].

Морфологию эритроцитов до и после замораживания изучали с помощью светового микроскопа. В суспензию эритроцитов с гематокритом 1,7% вносили альбумин в концентрации 1%, взвесь перемешивали и через 2 мин тестировали изменение морфологии. Альбумин является стабилизатором дискоидных форм эритроцитов (нормоцитов) в крови [21], поэтому по степени их трансформации в дискоциты можно судить об обратимости структурных нарушений в мембранах замороженных клеток.

Статистические расчеты производили на основе результатов, полученных на эритроцитах от пяти доноров. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $P < 0,05$ [22].

Результаты и обсуждение

Замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к значительному повреждению клеток — 55 и 60% до и после хранения, соответственно, а также к повышению проницаемости оставшейся части эритроцитов для ионов H^+ по сравнению с интактными клетками (табл. 1).

Включение в среду замораживания ДМСО способствует существенному снижению степени повреждения эритроцитов, при этом показатели проницаемости мембран для ионов H^+ достоверно не превышают аналогичные величины для интактных клеток (табл. 1).

Таблица 1. Степень повреждения и проницаемость мембран для ионов H^+ в эритроцитах, отмывтых после замораживания в жидком азоте в среде с ПЭГ-1500 (20%) в комбинации с ДМСО (15%)

| Состав среды замораживания | Гемолиз эритроцитов после отмывания криоконсерванта (%) | | Проницаемость оставшейся части эритроцитов для ионов H^+ ($P \cdot 10^8$ м/с) | |
|---|---|---------------------|--|---------------------|
| | Без хранения | 35 месяцев хранения | Без хранения | 35 месяцев хранения |
| ПЭГ-1500 | 55,0±3,8 | 60,0±3,2 | 2,33±0,31* | 2,35±0,29* |
| ПЭГ-1500 + ДМСО | 7,0±1,8 | 9,0±1,6 | 1,82±0,29 | 1,87±0,33 |
| Проницаемость интактных эритроцитов для ионов H^+ | | | 1,49±0,18 | |

* — $P < 0,05$ по сравнению с интактными эритроцитами.

Результаты исследования осмотического гемолиза замороженных эритроцитов представлены на рис. 1. В солевой среде с концентрацией NaCl 0,45–0,9% отмечается снижение осмотической устойчивости эритроцитов, замороженных в среде с ПЭГ-1500 (по сравнению с интактными клетками), в то время как при концентрации соли 0,09–0,4% происходит повышение осмотической устойчивости (рис. 1, кривая 3). При сочетании в среде замораживания ПЭГ-1500 и ДМСО кривая осмотического гемолиза замороженных эритроцитов несущественно отличается от таковой для интактных клеток, что указывает на сохранение осмотической хрупкости замороженных эритроцитов (рис. 1, кривая 2).

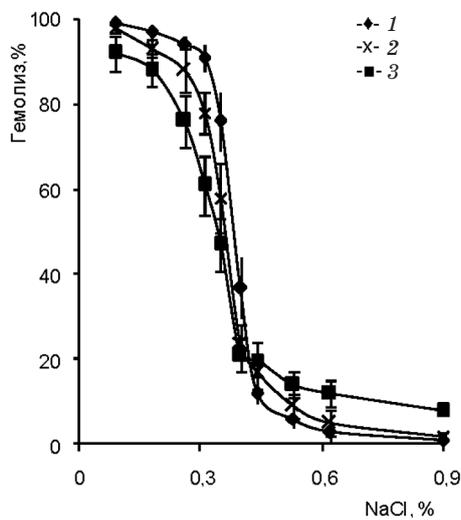


Рис. 1. Зависимость гемолиза от концентрации NaCl для эритроцитов, отмытых после замораживания и хранения в жидком азоте в различных средах:

1 — интактные клетки; 2 — среда, содержащая 20% ПЭГ-1500 и 15% ДМСО; 3 — среда, содержащая 20% ПЭГ-1500

Предполагается, что рост осмотической устойчивости эритроцитов в интервале показателей концентрации NaCl 0,09–0,4%, которые были заморожены в среде с ПЭГ-1500, связан с нарастанием градиента концентрации этого полимера на мембранах клеток во время охлаждения. При этом включение в среду замораживания ДМСО и поступление его в клетки способствует ослаблению осмотического стресса при замораживании, который индуцируется концентрированием непроницающего полимерного криопротектора [23].

Полученные результаты исследования проницаемости эритроцитов для ионов H^+ (табл. 1) и осмотического гемолиза (рис. 1) указывают на то, что комбинация в среде замораживания ПЭГ-1500 и ДМСО обеспечивает сохранение удовлетворительных осмотических свойств замороженных клеток.

Показатели содержания МДА и глутатиона в замороженных и хранившихся в жидком азоте эритроцитах свидетельствуют о том, что в клетках, не отмытых от криоконсерванта, определяется несколько большая концентрация МДА, чем в отмытых эритроцитах (табл. 2), однако эти изменения не достоверны. В то же время не отмечается значительного роста МДА после хранения эритроцитов, замороженных в среде с ПЭГ-1500 или в среде с ПЭГ-1500 и ДМСО.

В эритроцитах после замораживания и хранения в среде, содержащей ПЭГ-1500, после отмывания криоконсерванта существенно уменьшается концентрация глутатиона. Включение в среду замораживания дополнительно ДМСО не приводит к значительному уменьшению глутатиона в эритроцитах после отмывания криоконсерванта (табл. 2). Это указывает на меньшую потерю барьерной функции мембран для глутатиона при замораживании эритроцитов в комбинированном криоконсерванте с ПЭГ-1500 и ДМСО.

Таблица 2. Содержание МДА и восстановленного глутатиона в эритроцитах после замораживания и хранения в жидком азоте в средах с ПЭГ-1500 (20%) и ДМСО (15%)

| Условия эксперимента | | МДА (мкмоль/г Hb) | | Глутатион (мкмоль/г Hb) | |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Среды замораживания | Образцы эритроцитов | Без хранения | 35 месяцев хранения | Без хранения | 35 месяцев хранения |
| ПЭГ-1500 | С криоконсервантом | 1,15±0,18 | 1,35±0,21 | 9,5±1,7 | 8,3±1,3 |
| | После отмывания криоконсерванта | 1,02±0,16 | 1,21±0,19 | 5,1±0,81* | 4,0±0,7* |
| ПЭГ-1500 + ДМСО | С криоконсервантом | 1,17±0,19 | 1,32±0,23 | 10,0±1,8 | 9,9±1,6 |
| | После отмывания криоконсерванта | 1,04±0,15 | 1,08±0,17 | 9,1±1,2 | 8,1±1,4 |
| Для интактных эритроцитов | | 0,98±0,13 | | 10,5±1,6 | |

Активность глутатионзависимых энзимов после замораживания и хранения эритроцитов в жидком азоте существенно не изменялась (табл. 3).

На рис. 2 приведены микрофотографии эритроцитов, отмытых изотоническим раствором NaCl. Интактные клетки представлены (1) стоматоцитами (70–87%) и эхиноцитами (13–30%), а в присутствии альбумина (2) эритроциты преобразуются в дискоциты (нормоциты). Эритроциты, отмытые после замораживания и хранения с ПЭГ-1500, являются сфероцитами (3), присутствие альбумина в среде приводит к изменению формы клеток и они становятся эхиноцитами (4).

После замораживания и хранения в комбинированном криоконсерванте, содержащем ПЭГ-1500 и ДМСО, эритроциты представлены эхиноцитами и сфероэхиноцитами (5), однако присутствие в среде альбумина вызывает изменение формы клеток (6), и они становятся в основном дискоцитами (65–68%) с меньшим количеством содержания стоматоцитов (17–22%) и эхиноцитов (15%). Это свидетельствует о том, что эритроциты, замороженные в комбинированном криоконсерванте, смогут восстанавливать свою функциональную полноценность после попадания в кровяное русло.

Таким образом, замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500, приводит к значительному повреждению эритроцитов и ухудшению осмотических и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмытия криоконсерванта, однако достоверного накопления МДА в мембранах и изменения активности глутатионзависимых энзимов не происходит. Включение в состав среды проникающего криопротектора ДМСО приводит к незначительной степени повреждения эритроцитов и сохранению осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмытия криоконсерванта.

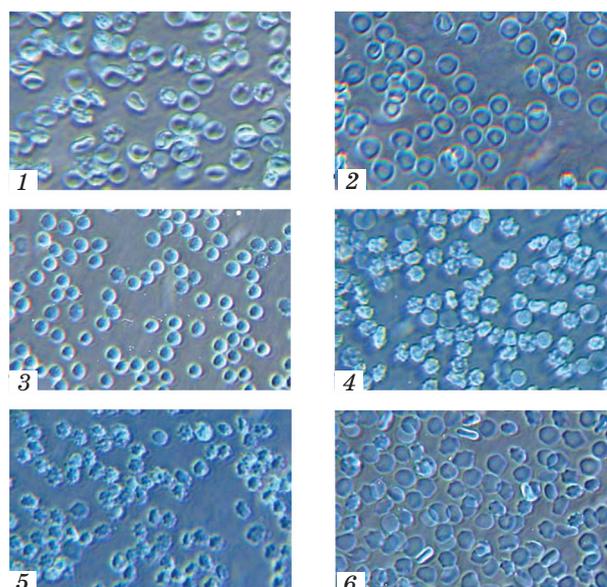


Рис. 2. Морфология эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl:

1, 3, 5 — без альбумина; 2, 4, 6 — при наличии альбумина (1%); 1, 2 — интактные клетки; 3, 4 — после замораживания и хранения в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500; 5, 6 — после замораживания и хранения в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500 и ДМСО

Восстановление метгемоглобина в гемоглобин обеспечивается энзимом метгемоглобинредуктазой с образованием супероксидного радикала, при нейтрализации которого образуется пероксид водорода. Из-за недостатка в эритроцитах глутатиона снижается активность глутатионпероксидазы, что способствует образованию гидропероксидов жирных кислот и повреждению мембран [1, 2]. Данные литературы указывают на существование взаимосвязи между реакциями ПОЛ и реакциями, поддерживающими гемоглобин в восстановленной форме.

Согласно этим данным, в клетках после замораживания изменяется равновесие между реакциями ПОЛ и антиоксидантными свойствами эритроцитов [3, 24]. При этом в мембранах клеток накапливается конечный продукт ПОЛ — МДА. Степень

Таблица 3. Активность энзимов глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в эритроцитах после замораживания и хранения в жидком азоте в среде с ПЭГ-1500 (20%) и ДМСО (15%)

| Среды замораживания | Глутатионпероксидаза (мкмоль глутатиона/мин · г Hb-1) | | Глутатионредуктаза (мкмоль НАДФН2/мин · г Hb-1) | |
|---------------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | Без хранения | 35 месяцев хранения | Без хранения | 35 месяцев хранения |
| ПЭГ-1500 | 145,6±20,2 | 142,3±23,0 | 12,4±2,1 | 11,8±1,9 |
| ПЭГ-1500 + ДМСО | 148,5±27,0 | 145,4±19,5 | 12,7±2,0 | 12,2±1,8 |
| Для интактных эритроцитов | 155,8±22,4 | | 14,6±2,3 | |

увеличения концентрации МДА определяет скорость замораживания и оттаивания. Чем ниже скорость охлаждения и оттаивания, тем выше уровень образования МДА в замороженных клетках. Наименьший прирост количества МДА наблюдается в быстро замороженных и быстро оттаявших клетках [24]. Кроме того, в быстро замороженных в жидком азоте эритроцитах в среде, содержащей гидроксипропилированный крахмал (ГЭК), при последующем хранении их в течение 1–6 мес при -80°C также выявлено повышение концентрации МДА [3]. С увеличением срока хранения эритроцитов от 1 до 6 мес отмечалось повышение их осмотической хрупкости. На основе таких результатов авторы пришли к заключению, что активация ПОЛ, приводящая к росту осмотической хрупкости эритроцитов, инициируется супероксидным радикалом, формирование которого индуцируется окислением гемоглобина в метгемоглобин при замораживании и хранении эритроцитов [3].

Результаты нашей работы указывают на отсутствие достоверного накопления МДА в мембранах эритроцитов после их замораживания и хранения в жидком азоте независимо от состава среды, а уменьшение концентрации восстановленного глутатиона в клетках связано с потерей барьерной функции мембран при отмывании криоконсерванта (табл. 2). Следует отметить, что эритроциты, замороженные в среде с ПЭГ-1500, имеют существенные отклонения осмотических показателей от таковых интактных клеток (табл. 1, рис. 1). Однако при хранении в замороженном состоянии в них не выявлено повышения концентрации МДА и существенного изменения активности глутатионпревращающих энзимов (табл. 2, 3). Установлено, что нарушение осмотических свойств замороженных эритроцитов не зависит от их антиоксидантных свойств, а определяется повреждениями, которые происходят непосредственно при замораживании-оттаивании. Замораживание и хранение эритроцитов в комбинированной среде, содержащей ПЭГ-1500 и ДМСО, приводит к незначительному повреждению клеток и сохранению их осмотических (табл. 1, рис. 1) и морфологических свойств (рис. 2). Это свидетельствует об эффективности использованной комбинированной среды при замораживании эритроцитов.

Согласно данным литературы, среда, содержащая ПЭК и ДМСО, является эффективным криоконсервантом для многих клеток, включая таковые костного мозга [25], гемопоэтические клетки кордовой крови

[26] и поджелудочной железы человека [27]. В данном случае использование комбинированного криоконсерванта исключает программное замораживание и позволяет замораживать клетки без контроля скорости охлаждения. Вероятно, это связано с тем, что при замораживании в таком комбинированном криоконсерванте снижается степень переохлаждения клеточных образцов, что уменьшает вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда [25].

Выявлено, что при замораживании-оттаивании эритроцитов сочетание в криоконсерванте декстрана или ПЭГ-1500 с ДМСО приводит к устранению эффекта «упаковки» и, соответственно, к ослаблению постгипертонического воздействия [11]. Устранение этого эффекта при замораживании в среде с глицеролом обеспечивает сохранение осмотической хрупкости эритроцитов [28]. Таким образом, криопротекторную эффективность комбинированной среды, содержащей ПЭГ-1500 и ДМСО, можно объяснить устранением эффекта «упаковки». Существует предположение, что увеличение степени повреждения эритроцитов, связанное с эффектом «упаковки», определяется механическими воздействиями кристаллов льда и увеличением концентрации раствора при замораживании [29], а также осмотическими воздействиями при размораживании вследствие плавления внеклеточных и внутриклеточных кристаллов льда [30]. В условиях быстрого замораживания и быстрого оттаивания (в нашей работе использовали именно такой подход) увеличение степени гемолиза в эффекте «упаковки» определяется постгипертоническим стрессом на конечной стадии быстрого размораживания из-за разведения внешней среды водой вследствие таяния льда, значительная часть которого была образована из внутриклеточной воды [13].

При замораживании криозащитные компоненты подвергаются концентрированию и оказывают не только протекторное, но и повреждающее действие. В этом контексте целесообразно проанализировать данные литературы.

Криозащитное действие полимерных непроникающих криопротекторов обусловлено их способностью обеспечивать сохранение репарационных свойств мембран, при этом размороженные клетки не теряют способности восстанавливать свой катионный баланс. Кроме того, защитное действие полимеров связано со структурированием воды и поддержанием ее в жидком состоянии при низких температурах в ходе замораживания

(до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$) [31]. Однако наряду с положительными эффектами полимеры, концентрируясь в ходе замораживания, способствуют нарастанию гипертоического градиента и повреждению клеточных мембран [31]. Криозащитное действие проникающих криопротекторов связано с проникновением их в клетки и уменьшением степени дегидратации клеток, при этом происходит замедление гиперконцентрирования. Вместе с тем уменьшение степени дегидратации клеток приводит к возрастанию вероятности формирования внутриклеточных кристаллов льда [31]. Таким образом, как у непроникающих, так и у проникающих криопротекторов существуют сопутствующие отрицательные свойства в цикле замораживания-оттаивания клеточных суспензий, которые, исходя из вышеизложенного, можно ослабить, комбинируя в среде замораживания два вида криопротекторов. Включение проникающего криопротектора в среду с непроникающим криопротектором и поступление его в клетки может привести к уменьшению степени их дегидратации и, соответственно, к ослаблению гипертоического стресса в ходе замораживания, обусловленного концентрированием непроникающего криопротектора. Уменьшение интенсивности гипертоического стресса создает условия для ослабления влияния осмотических механизмов повреждения при размораживании, что связано с флуктуационным входом и выходом воды в клетках при медленном размораживании [30] либо с постгипертоическим стрессом на конечном этапе быстрого оттаивания [13]. Приведенные данные указывают на вероятный механизм эффективности

комбинированных криоконсервантов, содержащих непроникающие и проникающие криопротекторы, вследствие которого устраняется эффект «упаковки».

Таким образом, замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к значительному повреждению клеток и существенному изменению осмотических и морфологических свойств оставшейся части эритроцитов после отмывания криоконсерванта. В то же время не выявлено достоверных изменений концентрации МДА и активности глутатион-метаболизирующих ферментов после длительного хранения эритроцитов в замороженном состоянии. Сочетание в криоконсерванте ПЭГ-1500 и ДМСО обеспечивает эффективные криозащитные свойства комбинированного состава, что снижает действие повреждающих факторов при замораживании-оттаивании и обеспечивает упрощение отмывания эритроцитов после размораживания изотоническим раствором NaCl без использования гипертоических сред. При этом эритроциты сохраняют осмотические, антиоксидантные и морфологические показатели, определенные для контроля. На основе полученных результатов с учетом данных литературы можно предположить, что криозащитная эффективность использованного комбинированного состава связана с поступлением в клетки ДМСО и, вследствие этого, ослаблением гипертоического стресса, обусловленного концентрированием непроникающих компонентов среды при замораживании, что обеспечивает сохранение устойчивости клеток к постгипертоическому стрессу при размораживании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pawlak W., Kedziora J., Zolynski K. et al. Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defense and lipid peroxidation in erythrocytes // *J. Gravit. Physiol.* — 1998. — V. 5, N 1. — P. 163–164.
2. Throm M. J., Stevens M. D., Hansen C. Benzocaine-induced methemoglobinemia in two patients: interdisciplinary collaboration, management, and near misses // *Pharmacotherapy.* — 2007. — V. 27, N 8. — P. 1206–1214.
3. Langer R., Herold T., Henrich H. A. Lipid peroxidation and hemolysis in HES cryopreserved erythrocytes // *Beitr Inf. Transf.* — 1996. — V. 33. — P. 111–116.
4. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.* — 1997. — V. 35, N 2. — P. 173–186.
5. Аграненко В. А., Федорова Л. И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. — М.: Медицина, 1983. — 96 с.
6. Sutteck A., Singbartl G., Langer R. et al. Cryopreservation of erythrocytes using hydroxyethyl starch: in vivo results of an autologous retransfusion model in humans // *Beitr Inf. Transf.* — 1994. — V. 32. — P. 44–47.
7. Wagner C. T., Martowicz M. L., Livesey S. A., Connor J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // *Cryobiology.* — 2002. — V. 45, N 2. — P. 153–166.
8. Михнович Е. П., Рождественская М. А., Нельский Г. Т. Криоконсервация эритроци-

- тов при -196°C с проникающими и непроникающими веществами / Акт. вопр. криобиол. криомед. — К.: Наук. думка, 1974. — С. 161–164.
9. *Панина Ю. Є.* Фізико-математична теорія гіпотонічного гемолізу еритроцитів людини: Автореф. дис. ... канд. фіз.-мат. наук.: 03.00.19. / Ін-т. пробл. криобіол. криомед., 1999. — 17 с.
 10. *Терехов Н. Т., Петров М. М., Буденная М. П., Тимченко Н. В.* Долгосрочное хранение эритроцитов методом замораживания при умеренно низких (-60° – -40°C) температурах / Метод. рекомендации. — К., 1986. — 15 с.
 11. *Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Проявление и устранение эффекта «упаковки» в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // Пробл. криобиол. — 2009. — Т. 19, № 3 — С. 312–323.
 12. *Pegg D. E., Diaper M. P.* The paking effect in erythrocyte freezing // Cryo Letters. — 1983. — V. 4, N 2. — P. 129–136.
 13. *Levin R. L.* The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing // Cryobiology. — 1982. — V. 19, N 6. — P. 669.
 14. *Woolgar A. E., Morris C. J.* Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic haemolysis of human red blood cells // Ibid. — 1973. — V. 10. — P. 82–86.
 15. *Mazur P., Miller R. H.* Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose // Ibid. — 1976. — V. 13, N 5. — P. 523–536.
 16. *Рамазанов В. В., Забродский Р. Ф., Найдюк Я. Ю., Бондаренко В. А.* Функционирование системы транспорта ионов H^+ при модификации мембран эритроцитов в условиях, моделирующих условия замораживания // Вісн. пробл. біол. мед. — 2010. — Вип. 3 — С. 186–192.
 17. *Beutler E.* Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. — New York.: Grune&Stratton, 1975. — 160 p.
 18. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 270 с.
 19. *Разыграев А. В., Арутюнян А. В.* Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) // Клин. лаб. диагност. — 2006. — № 6. — С. 13–16.
 20. *Юсупова Л. Б.* О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. — 1989. — № 4. — С. 19–21.
 21. *Hoffman J. F.* On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells // Blood Cells. — 1987. — V. 12, N 3. — P. 565–588.
 22. *Ашмарин И. П., Васильев И. П., Амбросов В. А.* Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. — Л.: Из-во Ленингр. ун-та, 1975. — 76 с.
 23. *Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // Пробл. криобиол. — 2010. — Т. 20, № 1 — С. 47–58.
 24. *Актуальные проблемы криобиологии* / Ред: Пушкарь Н. С., Белоус А. М. — К.: Наук. думка, 1981. — 608 с.
 25. *Luo K. G., Wu G., Q. Wang Q. et al.* Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells // Cryobiology. — 1994. — V. 31, N 4. — P. 349–354.
 26. *Liu K. Y., Dong W. C., Wang Y. L. et al.* Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. — 2004. — V. 12, N 5. — P. 670–673.
 27. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // Transplant Proc. — 2004. — V. 36, N 4. — P. 1133–1134.
 28. *Wagner C. T., Burnett M. B., Livesey S. A., Connor J.* Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // Cryobiology. — 2000. — V. 41, N 3. — P. 178–194.
 29. *Mazur P., Cole K. W.* Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // Ibid. — 1985. — V. 22, N 6. — P. 509–336.
 30. *Farrant J., Walter C. A., Lee H., McGann L. E.* Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // Ibid. — 1977. — V. 14, N 3. — P. 273–286.
 31. *Bakhach J.* The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues // Organogenesis. — 2009. — V. 5, N 3. — P. 119–126.

**ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ,
ЗАМОРОЖЕНИХ В КОМБІНОВАНОМУ
СЕРЕДОВИЩІ З ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЕМ
І ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ**

*У. У. Рамазанов
Т. І. Дейнеко
Е. Л. Воловельська
У. А. Коптелов
В. А. Бондаренко*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Досліджували осмотичні, антиоксидантні й морфологічні характеристики еритроцитів, заморожених в рідкому азоті ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) в середовищі, що містить поліетиленгліколь-1500, або в комбінованому середовищі з поліетиленгліколем ПЕГ-1500 і диметилсульфоксидом. При заморожуванні в середовищі, що містить поліетиленгліколь-1500, відзначається значний ступінь ушкодження еритроцитів (55–60%), втрата клітинами глутатіону під час відмивання кріоконсерванту і підвищення проникності частини клітин, що залишилася, для іонів H^+ . Водночас не виявлено істотного збільшення концентрації малонового діальдегіду і значної зміни показників активності глутатіонзалежних ензимів (глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази) при заморожуванні в двох зазначених середовищах. У разі додаткового включення в середовище диметилсульфоксиду ступінь ушкодження еритроцитів при заморожуванні знижується (7–9%) зі збереженням осмотичних, антиоксидантних і морфологічних властивостей частини клітин, що залишилася, після відмивання кріоконсерванту. Отримані результати дозволяють припустити, що збереження осмотичних і морфологічних властивостей еритроцитів, заморожених у комбінованому середовищі з поліетиленгліколем-1500 і диметилсульфоксидом, забезпечується проникненням останнього в клітини і ослабленням гіпертонічного стресу, зумовленого концентруванням NaCl та ПЕГ-150 при заморожуванні.

Ключові слова: еритроцити, осмотичні, антиоксидантні і морфологічні властивості, заморожування, комбінований кріоконсервант.

**PROPERTIES OF ERYTHROCYTES
FROZEN IN COMBINED MEDIUM
WITH POLYETHYLENE GLYCOL
AND DIMETHYLSULFOXIDE**

*V. V. Ramazanov
T. I. Dejneko
E. L. Volovelskaya
V. A. Koptelov
V. A. Bondarenko*

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

E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Osmotic, antioxidative and morphological characteristics of erythrocytes frozen in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) in a medium containing polyethylene glycol –1500 or in combined medium with polyethylene glycol-1500 and dimethylsulfoxide were studied. During freezing in medium containing polyethylene glycol –1500, significant rate of erythrocytes damage (55–60%), glutathione loss by the cells during cryopreservative washing-out and penetration increasing of rest of cells for H^+ ions were reported.

At the same time no significant increasing of malonic dialdehyde concentration and valuable change of indices of glutathione-metabolized enzymes activity (glutathione reductase and glutathione peroxidase) during freezing in two indicated media were found out. At additional introduction of DMSO into medium, damage rate of erythrocytes during freezing decrease significantly (7–9%) keeping the sufficient osmotic, antioxidative and morphological properties of the remained part of cells after cryopreservative washing-out.

The findings enable to suggest that osmotic and morphological properties retention of erythrocytes being frozen in combined medium with polyethylene glycol-1500 and dimethylsulfoxide were provided by penetration of the latter into the cells and weakening of hypertonic stress, stimulated by NaCl and polyethylene glycol-1500 concentration during freezing.

Key words: erythrocytes, osmotic, antioxidative and morphological properties, freezing, combined cryopreservative.