

Постгипертонический стресс и осмотические свойства замороженных-отогретых эритроцитов

Т.И. ДЕЙНЕКО¹, К.В. МАРКОВА², В.В. РАМАЗАНОВ¹, В.А. БОНДАРЕНКО¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Post-Hypertonic Stress and Osmotic Properties of Frozen-Thawed Erythrocytes

T.I. DEYNEKO¹, K.V. MARKOVA², V.V. RAMAZANOV¹, V.A. BONDARENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

При быстром замораживании-отогреве образцов клеток с высокой концентрацией (погружение в жидкий азот и отогрев на водяной бане при 40°C) значительный вклад в повреждение вносит постгипертонический стресс, которому подвергаются клетки на конечной стадии быстрого отогрева. В связи с этим возникает вопрос поиска подходов повышения устойчивости клеток к данному повреждающему фактору.

В эритроцитах, отмытых после замораживания в среде с декстраном, выявляются значительные изменения осмотических свойств по сравнению с интактными клетками. Наблюдается повышение осмотической устойчивости эритроцитов в гипотонической области концентрации NaCl (0,09–0,4%), которая усиливается при повышении концентрации декстрана в среде замораживания от 5 до 20%. В интервале концентрации NaCl 0,45–0,9% отмечается снижение осмотической устойчивости эритроцитов, которая не зависит от концентрации декстрана в среде замораживания. Кроме того, выявляется значительное снижение содержания глутатиона в клетках после их отмывания от криоконсерванта. Включение в среду замораживания проникающего криопротектора ДМСО в концентрации 5% уменьшает выраженность изменений указанных осмотических свойств и предотвращает потерю барьерной функции мембран для глутатиона.

На основе полученных результатов можно предположить, что образование гипотонической устойчивости замороженных-отогретых эритроцитов при концентрации NaCl 0,09–0,4% связано с концентрированием декстрана при замораживании, тогда как повышение осмотической хрупкости эритроцитов при концентрации NaCl 0,45–0,9% определяется общим повреждающим воздействием при замораживании-отогреве, включая гипертоническое и постгипертоническое воздействия. Включение в криоконсервант ДМСО и поступление его в клетки обеспечивают предупреждение их значительной дегидратации и ослабление повреждающего действия концентрационного градиента декстрана и гипертонического стресса при охлаждении. В результате эритроциты, замороженные в среде с декстраном и ДМСО, по сравнению со средой, содержащей только декстран, являются более устойчивыми к постгипертоническому стрессу при отогреве и сохраняют свои осмотические свойства.

Rapid freeze-thawing of highly concentrated cell samples (plunging into liquid nitrogen and thawing in water bath at 40°C) results in cell damage, which is mainly caused by post-hypertonic stress occurred in the cells during final stage of rapid thawing. In this regard the searching of approaches to increase the cell resistance to this damaging factor appears.

Significant changes of osmotic properties if compared with the intact cells are revealed in erythrocytes washed after freeze-thawing in the medium with dextran. The increasing of erythrocyte osmotic resistance is observed in hypotonic NaCl concentration (0.09–0.4%) with following rise after increasing the dextran concentration in freezing medium from 5 to 20%. Within the range of 0.45–0.9% NaCl concentration the reduction of erythrocyte osmotic resistance is observed, and no dependence on dextran concentration in freezing medium is found. Moreover, a significant reduction of glutathione content in the cells after removing the cryoprotectant is found. Introduction into freezing medium of 5% penetrating cryoprotectant DMSO decreases the intensity of changes in the mentioned osmotic properties and prevents the loss of barrier membrane function in respect of glutathione.

Based on the obtained results we may suggest that formation of hypotonic resistance of frozen-thawed erythrocytes in 0.09–0.4% NaCl concentration range is associated with dextran concentrating during freezing. Whereas the increasing of erythrocyte osmotic fragility in 0.45–0.9% NaCl concentration range is determined by total damaging effect during freeze-thawing, including hypertonic and post-hypertonic effects. Introduction of DMSO into cryopreservative and its entering into the cells provides the prevention of their significant dehydration and weakening of damaging effect of concentration gradient of dextran and hypertonic stress during cooling. Finally, the erythrocytes frozen in the medium with dextran are more resistant to post-hypertonic stress during thawing and preserve their osmotic properties.