

Вплив низькотемпературних фазових переходів на збереженість еритроцитів

П.Ю. Улізко¹, О.М. Боброва¹, Л.А. Водоп'янова²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Харківська державна зооветеринарна Академія, м. Харків

Influence of Low-Temperature Phase Transitions on Erythrocytes Integrity

P.Yu. Ulyzko¹, O.M. Bobrova¹, L.A. Vodopyanova²

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

²Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Кріоконсервування еритроцитів різних видів ссавців потребує розробки індивідуальних протоколів. Класичні для консервування еритроцитів людини кріозахисні розчини на основі гліцерину і 1,2-ПД мають низьку ефективність для заморожування еритроцитів бика і коня. На даний час створюються комбіновані середовища, які дозволяють підвищити показник збереженості деконсервованих еритроцитів ссавців. Основним чинником пошкоджень у процесі заморожування клітинних суспензій є фазові переходи.

Мета роботи – виявити вплив фазових переходів на збереженість еритроцитів бика, коня і кролика під час кріоконсервування у комбінованих захисних середовищах.

Кріозахисні розчини з різною концентрацією ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарози на фосфатно-сольовому буфері (рН 7,4) краплинно (у співвідношенні 1:1) додавали до відмитих еритроцитів бика, коня та кролика, інкубували 15 хв при 21°C. Отримані суспензії клітин охолоджували зі середньою швидкістю 200 град/хв зануренням у рідкий азот. Рівень гемолізу еритроцитів вимірювали спектрофотометричним методом. Низькотемпературні фазові переходи у суспензіях еритроцитів досліджували методом диференційної скануючої калориметрії на етапі нагріву зі швидкістю 0,5 град/хв.

На термограмах усіх суспензій еритроцитів із комбінованими кріозахисними розчинами зареєстровано стрибок теплопоглинання, який відповідає переходу з твердоаморфного стану у стан переохолодженої рідини, тобто розклуванню. Однак температура та інтенсивність цього процесу у всіх зразках різні. Рівень гемолізу після інкубації зі всіма середовищами був нижче 1%. Після заморожування-відігріву рівень гемолізу еритроцитів бика, коня та кролика різко підвищується. Більші інтенсивності стрибка теплопоглинання на термограмах відповідають меншим рівням гемолізу еритроцитів. Тобто перехід більшої кількості зразка до склоподібної фази під час охолодження дозволяє отримати менший гемоліз після відігріву. При цьому кількість речовини у склоподібному стані залежала від сумарної концентрації кріопротекторів у середовищі. Після відмивання від кріозахисного середовища спостерігалось подальше зростання рівня гемолізу, який залежав від співвідношення захисних речовин у середовищі консервування. Концентрації ПЕО-1500 вище 15% або ДМСО вище 10% збільшували рівень гемолізу під час відмивання. Найкращі результати збереженості деконсервованих клітин одержано у випадку використання середовища 15% ПЕО-1500; 10% ДМСО; 5% 1,2-ПД та 5% сахарози.

Таким чином, виявлено вплив низькотемпературних фазових переходів на збереженість еритроцитів ссавців після кріоконсервування.

Erythrocytes of different mammals need an individual approach when cryopreservation protocols are developing. Classical cryoprotective solutions for preserving human red blood cells based on glycerol and 1,2-PD have a low efficiency for freezing bovine and equine erythrocytes. At the present time the development of combined media is being developed, which allows to increase the integrity level of depreserved mammalian erythrocytes. The major damage factor during freezing of cell suspensions is phase transitions.

The purpose of the work is to detect the effect of phase transitions on integrity of bovine, equine and rabbit erythrocytes during cryopreservation in combined protective media.

Cryopreservation solutions with different concentrations of PEO-1500, DMSO, 1,2-PD and sucrose in phosphate-buffered saline (pH 7.4) were added drop by drop to the washed bovine, equine and rabbit erythrocytes (ratio of 1:1), incubated at 21°C for 15 minutes. The erythrocyte suspensions were cooled at an average rate of 200 deg/min by immersing into liquid nitrogen. The level of erythrocytes' hemolysis was measured by spectrophotometric method. Low-temperature phase transitions in erythrocyte suspensions were investigated by the method of differential scanning calorimetry during the heating stage at a rate of 0.5 deg/min.

On the thermograms of all erythrocyte suspensions with combined cryoprotective solutions, a jump of heat absorption corresponded to the transition from a solid amorphous state to a state of supercooled liquid was registered. However, the temperature and intensity of this process for all samples were different. Hemolysis level after incubation with all mediums was below 1%. After freezing-thawing the hemolysis of bovine, equine and rabbit erythrocytes increased sharply. Higher intensities of heat absorption jump on thermograms corresponded to lower intensities hemolysis' levels. That is, the transition of more sample to the glassy phase during cooling allowed for less hemolysis after heating. At the same time, the amount of matter in glassy state depended on the total concentration of cryoprotectants in the medium. After washing from the cryoprotective medium a further increase in hemolysis was observed, depended on the ratio of protective substances in the cryopreservation medium. PEO-1500 concentrations above 15% or DMSO higher than 10% increased the hemolysis levels during washing. The best results of the depreserved cells' integrity were obtained with a medium containing 15% PEO-1500, 10% DMSO, 5% 1,2-PD, and 5% sucrose.

Thus, the effect of low-temperature phase transitions on integrity of mammals' red blood cells after cryopreservation was revealed.