

Влияние криоконсервирования с ДМСО на сохранность и осмотическую хрупкость эритроцитов различных видов млекопитающих

UDC 57.043.591.111.1-96

P.YU. ULIZKO*, G.F. ZHEGUNOV, O.N. DENISOVA

Influence of Freeze-Thawing with DMSO on Integrity and Osmotic Fragility of Erythrocyte from Different Mammalian Species

В работе исследовали уровень сохранности эритроцитов быка, лошади, кролика в различных гипотонических средах после инкубирования и криоконсервирования с 10%-м диметилсульфоксидом (ДМСО). Показано, что интактные эритроциты всех видов исследуемых животных проявляют сходную осмотическую устойчивость, а ДМСО в указанной концентрации практически не влияет на этот параметр и сохранность клеток крови. Использование 10%-го ДМСО в процессе замораживания-отогрева без отмывания от криопротектора позволяет сохранить больше 80% эритроцитов исследуемых животных, однако его отмывание снижает этот показатель.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гемолиз, диметилсульфоксид, криоконсервирование, осмотическая хрупкость.

У роботі досліджували рівень гемолізу еритроцитів бика, коня, кроля в різних гіпотонічних середовищах після інкубації і криоконсервування з 10%-м диметилсульфоксидом (ДМСО). Показано, що інтактні еритроцити всіх видів досліджуваних тварин проявляють подібну осмотичну стійкість, а ДМСО в зазначеній концентрації практично не впливає на цей параметр і збереженість клітин крові. Використання 10%-го ДМСО в процесі заморожування-відігрівання без відмивання від криопротектора дозволяє зберегти до 80% еритроцитів досліджуваних тварин, проте при відмиванні від криопротектора цей показник знижується.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гемолиз, диметилсульфоксид, криоконсервування, осмотична стійкість.

In the research there was studied the hemolysis level of bovine, equine, and rabbit erythrocytes in different hypotonic media after incubation and freeze-thawing with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution. It was shown, that intact erythrocytes of all the examined animals demonstrated the similar osmotic stability in hypotonic conditions, and DMSO in the stated concentration does not significantly affect this parameter and red blood cell integrity. The use of 10% DMSO during freeze-thawing without washing-out the cryoprotectant allows to preserve up to 80% erythrocytes, however, the process of cryoprotectant removal reduces this index.

Key words: mammal erythrocytes, hemolysis, dimethyl sulfoxide, cryopreservation, osmotic fragility.

В настоящее время известны эффективные методы криоконсервирования эритроцитов человека [2, 3]. Однако для криоконсервирования эритроцитов домашних животных таких методов разработано недостаточно. В работах [6, 7] отмечено, что ДМСО защищает эритроциты млекопитающих в процессе замораживания-отогрева. Эритроциты разных млекопитающих имеют свои особенности [8, 12], поэтому важно было провести сравнительное исследование устойчивости эритроцитов быка, лошади, кролика к факторам низкотемпературного воздействия.

Известно, что структурно-функциональные изменения мембран играют важную роль в повреждении клеток под действием отрицательных температур [1, 14]. Криозащитное соединение ДМСО оказывает существенное влияние на структурные

Nowadays there are a number of effective methods for human erythrocyte cryopreservation [2, 3]. However, in the case of domestic animal erythrocytes there are only few methods. Recently [6, 7] it was shown that DMSO protects mammalian erythrocytes during freeze-thawing. Erythrocytes of different mammals have the specific properties [8, 12], so it was important to perform a comparative investigation on resistance of bovine, equine and rabbit erythrocytes to low-temperature effect factors.

Structural-functional changes in membranes are known to play an important role in cell damage resulted from influence of negative temperatures [1, 14]. Cryoprotective substance DMSO significantly affects the structural and functional properties of biological membranes [2, 4], likely influencing the erythrocyte sensitivity to osmotic effects [9, 15]. This paper repre-

Харьковская государственная зооветеринарная академия
МАП Украины

Kharkov State Zoo-Veterinary Academy, Kharkov region, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Академическая, 1, пгт Малая Даниловка, Харьковский р-н,
Харьковская обл.; электронная почта: prisil@i.ua

* To whom correspondence should be addressed: 1, Akademi-
cheskaya str., Malaya Danilovka, Kharkov district, Kharkov
region; e-mail: prisil@i.ua

и функциональные свойства биологических мембран [2, 4], что может влиять на чувствительность эритроцитов к осмотическим воздействиям [9, 15]. Изучали осмотическую хрупкость, являющуюся одним из критериев оценки сохранности мембран эритроцитов после действия экстремальных факторов [7, 13], которая может помочь объяснить негативное влияние замораживания-отогрева.

Цель работы – исследование влияния ДМСО, а также процесса замораживания-отогрева на сохранность и осмотическую чувствительность эритроцитов млекопитающих.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты половозрелых самцов быка, кролика и лошади. Эксперименты проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985 г.).

Эритроциты получали из цельной крови быка, кролика и лошади, заготовленной на консерванте “Глюгидир” в объемном соотношении 1:4. После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3-х минут в 4-кратном объеме изотонического раствора NaCl, содержащего 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,4.

Для замораживания использовали криоконсервирующую среду, содержащую 20% ДМСО, 150 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4 [7]. Криоконсервант добавляли капельно к эритроцитам в соотношении 1:1 при комнатной температуре в течение 15 мин. Для охлаждения образцы погружали в жидкий азот со средней скоростью 3,3 градуса/с до температуры -196°C , отогревали на водяной бане при температуре $40-42^{\circ}\text{C}$. Криопротектор удаляли поэтапным центрифугированием. На первом этапе к суспензии эритроцитов добавляли в равном объеме 0,6 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4. После этого эритроциты дважды промывали раствором 0,15 М NaCl на 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4.

Осмотическую хрупкость определяли путем переноса эритроцитов в растворы различной тоничности (0,2–0,9% NaCl) при комнатной температуре [9]. Количество вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100%-й гемолиз принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%. Сохран-

яет исследование осмотической хрупкости, что является одним из критериев для оценки целостности мембраны эритроцитов после воздействия экстремальных факторов [7, 13] и это может быть полезно для объяснения негативного влияния замораживания-отогрева.

Целью работы было исследование влияния ДМСО, а также процесса замораживания-отогрева на целостность и осмотическую чувствительность млекопитающих эритроцитов.

Материалы и методы

Для исследования использовали эритроциты зрелых быков, кролика и лошадей. Эксперименты проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985 г.).

Эритроциты получали из цельной крови быка, кролика и лошади, заготовленной на консерванте “Глюгидир” в объемном соотношении 1:4. После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3-х минут в 4-кратном объеме изотонического раствора NaCl, содержащего 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,4.

Для замораживания использовали криоконсервирующую среду, содержащую 20% ДМСО, 150 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4 [7]. Криоконсервант добавляли капельно к эритроцитам в соотношении 1:1 при комнатной температуре в течение 15 мин. Для охлаждения образцы погружали в жидкий азот со средней скоростью 3,3 градуса/с до температуры -196°C , отогревали на водяной бане при температуре $40-42^{\circ}\text{C}$. Криопротектор удаляли поэтапным центрифугированием. На первом этапе к суспензии эритроцитов добавляли в равном объеме 0,6 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4. После этого эритроциты дважды промывали раствором 0,15 М NaCl на 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4.

Осмотическую хрупкость определяли путем переноса эритроцитов в растворы различной тоничности (0,2–0,9% NaCl) при комнатной температуре [9]. Количество гемоглобина, вышедшего в супернатант, определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. За 100%-й гемолиз принимали поглощение пробы, в которую добавляли детергент тритон X-100 в концентрации 0,1%.

Экспериментальные результаты представили в виде арифметического среднего \pm SE. Различия между группами считали статистически значимыми по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Таблица представляет целостность эритроцитов от различных животных после влияния факторов низкой температуры.

ность эритроцитов определяли по количеству негемолизированных клеток.

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера. Различия между группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$

Результаты и обсуждение

В таблице представлена степень сохранности различных видов эритроцитов после влияния факторов низкотемпературного консервирования.

После инкубирования эритроцитов с ДМСО в течение 15 мин сохранность составляла до 98%, однако после удаления криопротектора она снизилась. После замораживания-отогрева эритроцитов в присутствии ДМСО этот показатель уменьшается, а после отмывки размороженных эритроцитов от криопротектора уровень сохранности уменьшается значительно. Следовательно, процесс отмывки оказывает негативное влияние на сохранность эритроцитов независимо от вида животного. Во всех экспериментах была отмечена тенденция к большей осмотической устойчивости эритроцитов кролика.

На следующем этапе работы была исследована осмотическая хрупкость, по которой возможно судить о механоэластических свойствах мембран эритроцитов. На рис. 1 видно, что после инкубирования с ДМСО в эритроцитах исследуемых видов животных вследствие осмотического воздействия происходят некоторые изменения в их мембранах. После криоконсервирования под защитой ДМСО у эритроцитов лошади и быка наблюдается увеличение осмотической хрупкости, что видно из сдвига кривой лизиса эритроцитов в гипотонических растворах в сторону увеличения концентрации NaCl. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов кролика после всех этапов криоконсервирования сходен с показателями контрольной группы, что, возможно, свидетельствует об их большей осмотической устойчивости.

На рис. 2 показан индекс осмотической хрупкости, определенный как концентрация NaCl, при которой происходит 50%-й гемолиз.

Установлено, что инкубация с ДМСО практически не

After incubation of erythrocytes with DMSO during 15 min the integrity was up to 98%, however, after removing of cryoprotectant it decreased. After freeze-thawing of erythrocytes in DMSO presence this index decreased and after removing of cryoprotectant from the thawed erythrocytes the integrity level of the cells decreased significantly. Consequently, the washing-out process negatively affects an erythrocyte integrity in spite of animal species. In all the experiments a tendency for high osmotic resistance of rabbit erythrocytes was noted.

At the next stage of experiment an osmotic fragility was examined, enabling the discussion of mechanoelastic properties of erythrocyte membranes. Fig. 1 shows that after incubation with DMSO in erythrocytes of the investigated animal species some changes in their membranes take place due to osmotic effect. After freeze-thawing under DMSO protection an increase of osmotic fragility of equine and bovine erythrocytes is observed, which is confirmed by curve shift of erythrocyte lysis in hypotonic solutions along the rise in NaCl concentration. Index of rabbit erythrocyte osmotic fragility after all cryopreservation stages is similar to the indices of the control group, probably testifying to their high osmotic resistance.

Fig. 2 showed the index of osmotic fragility determined as NaCl concentration at which 50% hemolysis occurred.

It was established that incubation with DMSO almost did not affect the erythrocyte osmotic fragility coefficient for the investigated animals, but after freeze-thawing in presence of DMSO the index of osmotic fragility somewhat increases. It is possible, that after freeze-thawing of erythrocyte in presence of 10% DMSO the membrane microviscosity decreases [7], that leads to an increase in membrane permeability and to a rise of osmotic fragility index [5]. The least index of osmotic fragility is typical for rabbit erythro-

Сохранность эритроцитов после инкубирования и криоконсервирования с ДМСО
Erythrocytes integrity after incubation and cryopreservation with DMSO

Эритроциты Erythrocytes	Условия эксперимента Experimental conditions			
	Инкубирование с ДМСО, % Incubation with DMSO, %		Замораживание-отогрев с ДМСО, % Freeze-thawing with DMSO, %	
	без отмывки криопротектора non-washed	после отмывки криопротектора washed	без отмывки криопротектора non-washed	после отмывки криопротектора washed
Быка Bovine	99,5 \pm 0,2	96,0 \pm 0,7	85,6 \pm 1,8	54,5 \pm 2,5
Кролика Rabbit	99,4 \pm 0,3	96,5 \pm 0,6	86,5 \pm 1,4	56,3 \pm 2,3
Лошади Equine	56,3 \pm 2,3	95,0 \pm 0,5	84,0 \pm 1,7	53,1 \pm 2,8

влияет на коэффициент осмотической хрупкости эритроцитов исследуемых животных, но после криоконсервирования в его присутствии индекс осмотической хрупкости несколько увеличивается. Вероятно, после криоконсервирования эритроцитов с 10%-м ДМСО микровязкость мембран снижается [7], что приводит к увеличению проницаемости мембран и повышению индекса осмотической хрупкости [5]. Наименьший индекс осмотической хрупкости характерен для эритроцитов кролика, что, возможно, связано с их структурными особенностями [10, 11, 14], так как известно, что в мембранах эритроцитов кроля содержится больше фосфолипидов, меньше гликолипидов и холестерина, чем в мембранах эритроцитов быка и лошади.

cytes that is likely associated with their structure peculiarities [10, 11, 14], since rabbit erythrocyte membranes are known to contain more phospholipids, less glycolipids and cholesterol, comparing to bovine and equine erythrocytes.

Conclusions

1. Bovine, rabbit and equine erythrocytes have similar osmotic resistance to hypotonia.
2. Incubation of investigated mammalian erythrocytes with 10% DMSO does not significantly affect their osmotic resistance.
3. Application of 10% DMSO during freezing down to temperature of liquid nitrogen and warming in waterbath at 40–42°C without removing the cryo-

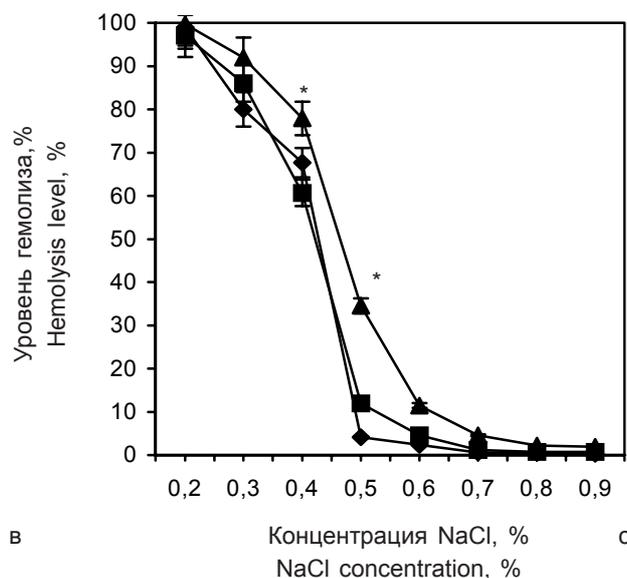
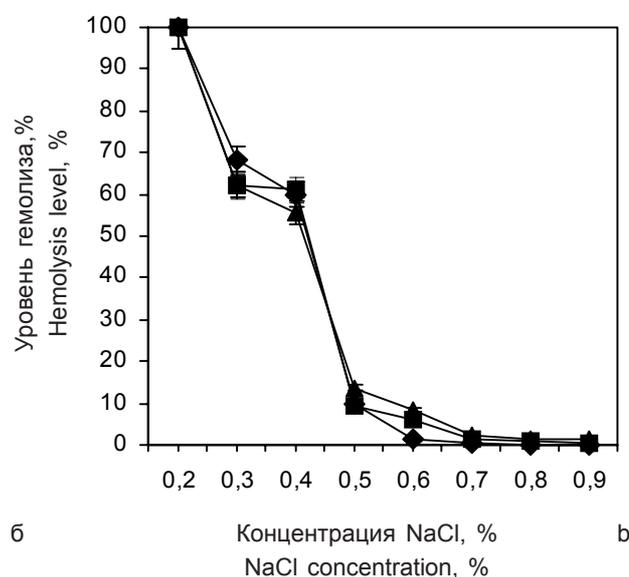
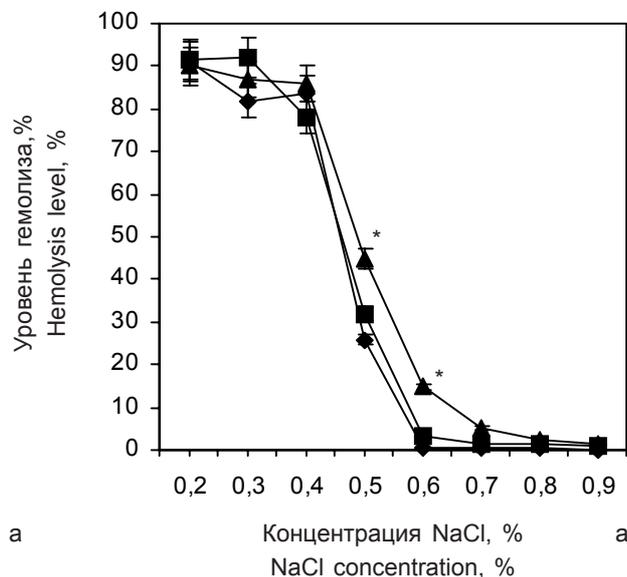


Рис. 1. Кривые осмотической хрупкости эритроцитов: а – быка; б – кролика; в – лошади: ◆ – intactные клетки; ■ – клетки, инкубированные с ДМСО и отмытые; ▲ – клетки, криоконсервированные с ДМСО и отмытые; * – различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к intactным клеткам.

Fig. 1. Erythrocyte osmotic fragility curves of: a – bovine; b – rabbit, c – equine: ◆ – intact cells; ■ – incubated with DMSO and washed cells; ▲ – frozen-thawed with DMSO and washed cells; * – differences are significant ($p < 0.05$) comparing to intact cells.

Рис. 2. Индекс осмотической хрупкости эритроцитов: 1 – быка; 2 – кролика; 3 – лошади; ■ – интактные клетки; □ – клетки, инкубированные с ДМСО и отмытые; ▒ – клетки, криоконсервированные с ДМСО и отмытые; * – различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к нативным клеткам.

Fig. 2. Erythrocyte osmotic fragility index of: 1 – bovine; 2 – rabbit; 3 – equine cells; ■ – intact cells; □ – incubated with DMSO and washed cells; ▒ – frozen-thawed with DMSO and washed cells; * – differences are significant ($p < 0.05$) as for native cells.

Выводы

1. Эритроциты быка, кролика и лошади обладают сходной осмотической устойчивостью к гипотонии.

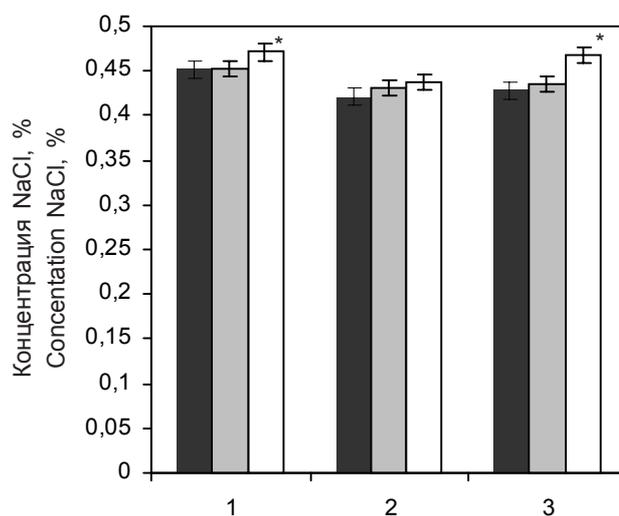
2. Инкубирование эритроцитов исследуемых млекопитающих с 10%-м ДМСО существенно не влияет на их осмотическую устойчивость.

3. Использование 10%-го ДМСО в процессе замораживания до температуры жидкого азота и отогрева на водяной бане при температуре 40–42°C/с без отмытки от криопротектора позволяет сохранить эритроцитов быка – 85,6, кролика – 86,5 и лошади до 84,0%, однако его отмытка снижает этот показатель до 54,5; 56,3; 53,1% соответственно.

4. Большую устойчивость к гипотонии после криоконсервирования с 10%-м ДМСО проявляют эритроциты кролика по сравнению с эритроцитами быка и лошади.

Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А., Бондаренко Т.П. Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.– 1985.– №2.– С. 25–32.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 432 с.
3. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.– Харьков, 1987.– 32 с.
4. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико–химическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека // Біофізичний вісник.– 1998, Вип. 2.– С. 54–58.
5. Гулевский А.К. Барьерно–транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.– Харьков, 1986.– 42 с.
6. Денисова О.Н., Жегунов Г.Ф. Изучение содержания АТФ в эритроцитах млекопитающих после криоконсервирования // Проблеми зооінженерної та ветеринарної медицини.– Харків, 2007.– Вип. 14.– С. 42–46.
7. Денисова О.Н. Криочувствительность эритроцитов различных видов млекопитающих: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 2006.– 20 с.
8. Черницкий Е.А., Воробей А.Б. Структура и функция эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 213 с.



protectant allows to preserve 85.6% of bovine erythrocytes, 86.5% of rabbit cells and up to 84.0% of equine cells, however, removing of DMSO decreases this index to 54.5; 56.3 and 53.1%, correspondingly.

4. Rabbit erythrocytes unlike bovine and equine cells, show higher resistance to hypotonia after freeze-thawing with 10% DMSO.

References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A., Babiychuk L.A., Bondarenko T.P. Single mechanism of cell damage at thermal shock, freezing and posthypertonic lysis // Kriobiologiya.– 1985.– N2.– P. 25–32.
2. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 432 p.
3. Vorotilin A.M. Cryopreservation of human erythrocytes under cryoprotectant protection at the base of low-molecular diols: Abstract of doctor of biological sciences thesis.– Kharkov, 1987.– 32 p.
4. Gordienko E.A., Panina Yu.E. Physical-chemical phenomenon model of human erythrocyte hypotonic hemolysis // Biophysical Bulletin.– 1998.– Issue 2.– P. 54–58.
5. Gulevskiy A.K. Barrier-transport properties of plasma membranes during cryopreservation process: Author's abstract of the thesis ... of doctor of biological sciences.– Kharkov, 1986.– 42 p.
6. Denisova O.N., Zhegunov G.F. Investigation of ATP content in mammalian erythrocytes after cryopreservation // Problemy Zooinzhenernoyi ta Veterinaryarnoyi Medytsyny.– Kharkov, 2007.– Issue 14.– P. 42–46
7. Denisova O.N. Erythrocyte cryosensitivity of different mammalian types: Author's abstract of thesis ... of candidate of biological sciences.– Kharkov, 2006.– 20 p.
8. Chernitskiy E.A., Vorobey A.B. Structure and function of erythrocyte membranes.– Minsk: Nauka i Tekhnika, 1981.– 231 p.
9. Ballas S.K. Red cell membrane protein in change caused by freezing and mechanism of cryoprotection by glycerol // Transfusion.– 1981.– Vol. 21, N2.– P. 203–210.
10. Betticher D.C., Geiser J. Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.– 1989.– Vol. 93, N2.– P. 429–432.
11. Engen R.L., Clark C.L. High-performance liquid chromatography determination of erythrocyte membrane phospholipid

9. *Ballas S.K.* Red cell membrane protein in change caused by freezing and mechanism of cryoprotection by glycerol // *Transfusion.*— 1981.— Vol. 21, N2.— P. 203–210.
10. *Betticher D.C., Geiser J.* Resistance of mammalian red blood cells of different size to hypertonic milieu // *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.*— 1989.— Vol. 93, N2.— P. 429–432.
11. *Engen R.L., Clark C.L.* High-performance liquid chromatography determination of erythrocyte membrane phospholipid composition in several animal species // *Am. J. Vet. Res.*— 1990.— Vol. 51, N1.— P. 577–580.
12. *Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.* Clinical biochemistry of domestic animals.— New York: Academic Press, 1989.— 932 p.
13. *Nayma S., Noorzahan B., Shelina B. et al.* Oral supplementation of vitamin E reduces osmotic fragility of RBC in hemolytic anemic patients with g6pd // *Pak. J. Physiol.*— 2009.— Vol. 5.— P. 413–418.
14. *Nouri-Sorkhabi M.H., Agar N.S., Sullivan D. R. et al.* Phospholipid composition of erythrocyte membranes and plasma of mammalian blood including Australian marsupials; quantitative 31P NMR analysis using detergent // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*— 1996.— Vol. 113, N2.— P. 221–227.
15. *Shinitzky M.* Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1984.— Vol. 738, N1.— P. 251–261.

Accepted in 04.03.2010

*Поступила 04.03.2010
Рецензент Т.П. Линник*