© В. В. Рамазанов, Е. Л. Воловельская, В. А. Коптелов, В. А. Бондаренко

УДК 57. 043: 547. 42: 611. 018. 51

В. В. Рамазанов, Е. Л. Воловельская, В. А. Коптелов, В. А. Бондаренко

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В СРЕДЕ С ДЕКСТРАНОМ, ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ И ГЛЮКОЗОЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом темы «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных веществ и криопротекторов» (№ гос. регистрации 0104U006437).

Вступление. Существует предположение о том, что рост осмотической хрупкости эритроцитов при замораживании и хранении при -80˚С определяется окислением гемоглобина в метгемоглобин и развитием перекисного окисления липидов мембран [9]. Окисление гемоглобина в метгемоглобин происходит с образованием супероксидного радикала, который нейтрализуется супероксиддисмутазой с образованием пероксида водорода, утилизация которого осуществляется каталазой и глутатионпероксидазой. Недостаток глутатиона в клетках приводит к снижениею активности глутатионпероксидазы, повышению концентрации пероксида водорода, образованию гидроперекисей жирных кислот и повреждению мембран [12, 14]. В эритроцитах быстро замороженных в жидком азоте (-196єС) в среде, содержащей гидроксиэтилированный крахмал после хранения при -80˚С происходит повышение концентрации малонового диальгегида (МДА). При этом увеличение срока хранения от 1 до 6 месяцев приводит к повышению осмотической хрупкости эритроцитов [9].

Цель работы – определить взаимосвязь антиоксидантных и осмотических характеристик эритроцитов после замораживания и хранения в жидком азоте (-196єС) в средах с декстраном, диметилсульфоксидом и глюкозой.

Объект и методы исследования. В работе использовали NaCl (х. ч.), сахарозу (ч. д. а.), глюкозу (ч. д. а.), декстран с молекулярной массой 35000, производства Serva, диметилсульфоксид (ДМСО), производства Sigma. Среды замораживания готовили на растворе, содержащем 0,3% NaCl и 6,85% сахарозы. Криоконсерванты содержали 20% декстрана или 20% декстрана в комбинации с ДМСО (7%) и глюкозой (2%).

Эритроциты человека получали из крови 2-й группы от доноров мужского пола после четырехкратного отмывания их изотоническим раствором NaCl. Металлические контейнеры объемом 10мл с образцами эритроцитов в средах замораживания с гематокритом 40% инкубировали

30 мин при 25˚С, затем погружали в жидкий азот (-196єС) на 30 мин или хранили в жидком азоте в течение 35 месяцев. Замороженные образцы эритроцитов размораживали на водяной бане при 40˚С в течении 3 мин. Затем к 1мл размороженной клеточной суспензии, при перемешивании, медленно добавляли 9мл теплого (37˚С) изотонического раствора NaCl в течение не менее 30 секунд (скорость добавления не более 0,3мл/сек). Суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Данную процедуру разведения и центрифугирования повторяли еще один раз. После этого эритроциты трижды отмывали теплым (37єС) изотоническим раствором NaCl, при этом скорость разведения осадка эритроцитов не учитывали.

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 1мл с гематокритом 0,6% инкубировали в течение 15 мин при 25˚С, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 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 [10]:

степень гемолиза (%)=[A_1/A_2] Ч 100%,

где A_1 – поглощение супернатанта экспериментального образца;

A_2 – поглощение при полном гемолизе контрольного образца.

Содержание глутатиона в эритроцитах определяли спектрофотометрически с использованием дитиобиснитробензойной кислоты при длине волны 412 нм [5].

Определение малонового диальдегида (МДА) производили спектрофотометрически при длине волны 535 нм с использованием тиобарбитуровой кислоты методом [3].

Морфологию эритроцитов до и после замораживания изучали с помощью светового микроскопа. В суспензию эритроцитов с гематокритом 1,7%

Таблица 1

Степень гемолиза эритроцитов при отмывании после замораживания и хранения в жидком азоте (-196єС) в различных средах, приготовленных на сахарозо-солевом растворе

Среды замораживания	Гемолиз эритроцитов после отмывания криоконсерванта,%	
	Без хранения	35 месяцев хранения
Декстран (20%)	41,8±3,3	48,0±3,6
Декстран (20%)+ДМСО (7%)	13,8±3,2	14,7±3,7
Декстран (20%)+ДМСО (7%)+глюкоза (2%)	6,0±2,3	6,0±2,5

вносили альбумин в концентрации 1%, взвесь перемешивали и через 2 мин тестировали изменение морфологии. Альбумин является стабилизатором дискоидных форм эритроцитов (нормоцитов) в крови [8], 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 5 доноров. Данные представлены как среднее значение±стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $p< 0,05$ [2].

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты, полученные после замораживания и хранения эритроцитов в различных средах представлены в **табл. 1**. Эритроциты, отмытые после замораживания в среде, содержащей декстран, выявляют значительную степень повреждения. Хранение приводит к некоторому повышению степени повреждения клеток. В среде, содержащей дополнительно ДМСО или ДМСО и глюкозу, степень повреждения эритроцитов значительно ниже, чем в среде, содержащей декстран, и не отмечается повышения степени повреждения клеток после хранения в жидком азоте **(табл. 1)**.

Показатели содержания МДА и глутатиона для замороженных и хранившихся в жидком азоте эритроцитов представлены в **табл. 2.** Результаты показывают, что в клетках, не отмытых от криоконсерванта, определяется несколько большая концентрация МДА, чем в отмытых эритроцитах, однако эти изменения недостоверны. В эритроцитах, замороженных в среде с декстраном или с декстраном в комбинации с ДМСО или ДМСО и глюкозой, после хранения не отмечается значительного роста МДА. **(табл. 2)**.

При замораживании и хранении эритроцитов в среде, содержащей декстран, после отмывания криоконсерванта значительно уменьшается концентрация глутатиона. Результаты указывают на то, что замораживание с данным полимером приводит к потере барьерной функции мембран для глутатиона. В то же время, включение в среды замораживания дополнительно ДМСО или ДМСО+глюкоза, не приводило к значительному уменьшению глутатиона в эритроцитах после отмывания криоконсерванта **(табл. 2)**. Это указывает на сохранение барьерной функции мембран для глутатиона при замораживании в комбинированных средах.

Исследование осмотического гемолиза эритроцитов, отмытых после замораживания и хранения в криоконсервантах различного состава показало, что эритроциты, замороженные в среде с декстраном, значительно отличаются по осмотической хрупкости от интактных клеток **(рис. 1)**. Это проявляется в том, что осмотическая устойчивость

Таблица 2

Содержание МДА и глутатиона в эритроцитах после замораживания и хранения в жидком азоте (-196єС) в различных средах, приготовленных на сахарозо-солевом растворе

Условия эксперимента		МДА (мкмоль/гр. Hb)		Глутатион (мкмоль/гр. Hb)	
Среды замораживания	Образцы эритроцитов	Без хранения	35 месяц. хранения	Без хранения	35 месяц. хранения
с криоконсервантом	1,02±0,16	1,37±0,19	11,2±1,7	8,7±1,1	
	после отмывания криоконсерванта	0,89±0,14	1,18±0,17	5,5±0,7*	3,8±0,6*
с криоконсервантом	1,08±0,16	1,29±0,19	10,9±1,6	9,6±1,4	
	после отмывания криоконсерванта	0,88±0,13	1,04±0,16	8,7±1,2	7,5±1,3
с криоконсервантом	0,99±0,15	1,24±0,18	10,5±1,4	9,4±1,5	
	после отмывания криоконсерванта	0,85±0,12	0,98±0,16	8,5±1,3	7,02±1,3
интактные клетки		0,98±0,13		10,5±1,6	

Примечание: *– статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями в среде с криоконсервантом ($p<0,05$).

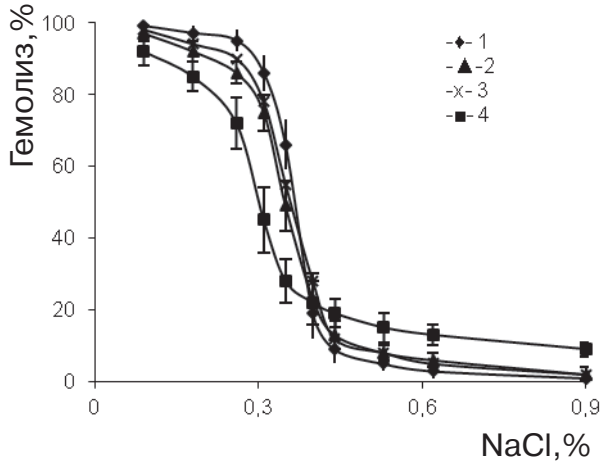

Рис. 1. Осмотический гемолиз эритроцитов, замороженных в различных средах, приготовленных на сахарозо-солевом растворе: 2 – декстран, ДМСО и глюкоза; 3 – декстран и ДМСО; 4 – декстран. 1 – интактные клетки.

замороженных эритроцитов при концентрации NaCl 0,45-0,9% ниже, тогда как при 0,09-0,4% – выше, чем для интактных клеток **(рис. 1)**. Кривые осмотического гемолиза эритроцитов, замороженных в комбинированной среде, содержащей декстран и ДМСО или декстран, ДМСО и глюкозу подобны кривой для интактных клеток **(рис. 1)**.

Интактные эритроциты в физиологическом растворе NaCl представлены в основном стоматоцитами и значительно меньшим количеством эхиноцитов **(рис. 2, фото 1)**. Включение в среду альбумина приводит к преобразованию клеток в дискоциты (нормоциты) **(рис. 2, фото 3)**. Результаты после криоконсервирования показали, что эритроциты, отмытые после замораживания и хранения в жидком азоте в комбинированной среде, содержащей 20% декстрана, 7% ДМСО и 2% глюкозы представлены эхиноцитами и сфероэхиноцитами **(рис 2, фото 2)**. Включение в среду альбумина вызывает изменение формы клеток, и основная часть эритроцитов приобретает форму дискоцитов **(рис. 2, фото 4)**. Полученные результаты согласуются с тем, что альбумин является стабилизатором дискоидных форм эритроцитов [8].

Таким образом, замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте в комбинированном криоконсерванте с непроникающим и проникающим криопротекторами приводит к незначительной степени повреждения клеток и несущественному изменению их антиоксидантных, осмотических и морфологических свойств. Это указывает на то, что замороженные эритроциты, возможно, смогут восстанавливать свою функциональную полноценность после попадания в кровяное русло.

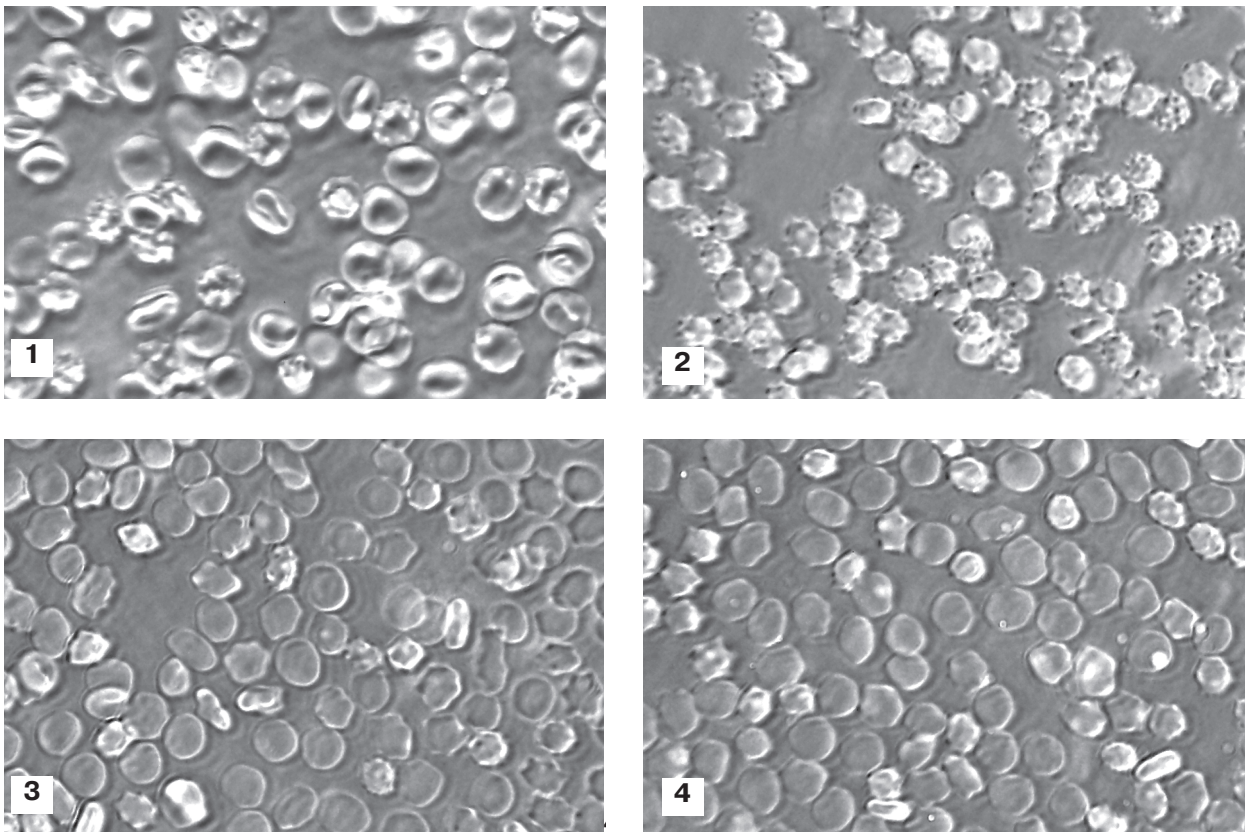

Рис. 2. Морфология интактных (1,3) и отмытых после замораживания и хранения в жидком азоте (2,4) эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl в отсутствии (1,2) и присутствии (3,4) альбумина (1%).

Согласно данным литературы в клетках после замораживания изменяется равновесие между реакциями перекисного окисления липидов и реакциями антиоксидантной системы [1, 9]. При этом в мембранах клеток накапливается конечный продукт перекисного окисления липидов МДА. Степень увеличения концентрации МДА определяется скоростями замораживания и размораживания. Чем ниже скорости охлаждения и отогрева образцов, тем выше уровень образования МДА в замороженных клетках. Наименьший прирост концентрации МДА выявляется в клетках, которые были быстро заморожены и быстро отогреты. [1]. Кроме того, в быстро замороженных эритроцитах в среде, содержащей 12,5% гидроксиэтилированного крахмала и 60 ммоль/л NaCl, с последующим хранением в течение 1-6 месяцев при -80єС, также происходит накопление МДА [9]. Содержание МДА после 6-ти месяцев хранения увеличивалось от 0,4 мкмоль/л клеток для интактных эритроцитов до 8 мкмоль/л клеток после хранения. С увеличением срока хранения от 1 до 6 месяцев повышалась осмотическая хрупкость эритроцитов [9]. На основе таких данных авторы пришли к заключению, что активация реакций перекисного окисления липидов, которая приводит к росту осмотической хрупкости эритроцитов, инициируется супероксидным радикалом, формирование которого, индуцируется окислением гемоглобина в метгемоглобин при замораживании и хранении эритроцитов [9].

Окисление гемоглобина в метгемоглобин осуществляется под действием кислорода. При этом восстановление гемоглобина обеспечивается метгемоглобин-редуктазой, а образующийся супероксидный радикал нейтрализуется супероксиддисмутазой с образованием пероксида водорода. Утилизация пероксида водорода осуществляется каталазой и глутатион-пероксидазой. Недостаток в эритроцитах глутатиона приводит к снижению активности глутатион-пероксидазы, накоплению пероксида водорода, образованию гидроперекисей жирных кислот и разрушению мембран [12, 14]. Описанные данные литературы указывают на существование взаимосвязи между реакциями перекисного окисления липидов и реакциями, которые поддерживают гемоглобин в восстановленной форме.

Полученные результаты показывают, что эритроциты, отмытые после замораживания и хранения в жидком азоте в комбинированной среде с непроникающим (декстран) и проникающими (ДМСО, глюкоза) криопротекторами, имеют невысокую степень повреждения и удовлетворительные антиоксидантные, осмотические и морфологические характеристики. Эффективность комбинированных криоконсервантов может быть связана с уменьшением «токсичности» основного криопротектора в присутствии дополнительных защитных компонентов. Замораживание клеток почек кролика с ДМСО в высокой концентрации оказывает на них повреждающее действие, однако в присутствии амидов эффективность среды замораживания существенно повышается [7]. Кроме того, глюкоза также является эффективным нейтрализатором «токсичности» ДМСО [6]. Показано, что полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 не выявляет криопротекторного действия, однако комбинирование его со смесью ДМСО+глюкоза приводит к хорошему криопротекторному эффекту по отношению к культуре растительных клеток [15]. Полученные нами результаты при сочетании ДМСО+глюкоза с декстраном, также указывают на хорошую криопротекторную эффективность данного комбинированного состава относительно сохранности антиоксидантных, осмотических и морфологических свойств эритроцитов.

Необходимо отметить, что после замораживания эритроцитов в среде с декстраном отмечается их необычное осмотическое свойство, которое заключается в том, что при концентрации NaCl 0,45-0,9% клетки являются осмотически неустойчивыми, тогда как при концентрации NaCl 0,09-0,4% они более осмотически устойчивы, чем интактные клетки **(рис. 1)**. Подобное осмотическое свойство было выявлено для эритроцитов, замороженных в среде с декстраном или трегалозой, но не с глицерином [13]. Это указывает на то, что полученный эффект выявляется только после замораживания эритроцитов в средах с непроникающими в клетки криопротекторами. Известно, что непроникающие криопротекторы, концентрируясь в ходе замораживания, вносят вклад в нарастание гипертонического градиента на клеточных мембранах [4, 11]. В среде, содержащей сахарозу и полимер, клетки при замораживании могут испытывать гипертонический стресс из-за значительной дегидратации [11]. Вероятно, эритроциты приобретают необычные осмотические свойства вследствие гипертонического стресса. Защитный эффект проникающих криопротекторов связан с замедлением гиперконцентрирования среды и уменьшением степени дегидратации клеток в ходе замораживания [4], поэтому включение их в среду с непроникающими криопротекторами может ослабить дегидратацию клеток и, соответственно, гипертонический стресс, который создается концентрированием непроникающих криопротекторов. Вышеизложенное позволяет предположить, что выявленная криопротекторная эффективность комбинированной среды определяется поступлением в клетки ДМСО и глюкозы и ослаблением гипертонического стресса на мембраны, который создается концентрированием декстрана и сахарозы при замораживании.

Таким образом, замораживание эритроцитов в среде с декстраном, приготовленной на сахарозосолевом растворе приводит к значительной степени их повреждения, потере барьерной функции мембран для глутатиона и существенному изменению кривых осмотического гемолиза по сравнению с интактными эритроцитами. Однако при хранении клеток в жидком азоте

(-196єС) не выявлено достоверного увеличения концентрации МДА. При включении в среду замораживания дополнительно ДМСО или ДМСО

и глюкозы степень повреждения клеток была невысокой, процедура отмывания не приводила к значительной потере глутатиона, а отмытые клетки незначительно отличались по осмотическим свойствам от интактных эритроцитов. Эритроциты, отмытые после замораживания в комбинированной среде с декстраном, ДМСО и глюкозой, морфологически представлены эхиноцитами и сфероэхиноцитами, под воздействием альбумина изменяют форму и становятся в основном дискоцитами с невысоким содержанием эхиноцитов. Полученные результаты позволяют предположить, что при замораживании и хранении эритроцитов в жидком азоте (-196єС) в среде с декстраном нарушение осмотических свойств клеток не связано с перекисным окислением липидов мембран, а определяется вкладом концентрирования использованного полимера и сахарозы в общий гипертонический стресс.

Выводы.

1. В эритроцитах, отмытых после замораживания в среде с декстраном, отмечаются значительные изменения осмотических свойств по сравнению с интактными клетками: а) снижается осмотическая устойчивость в интервале концентрации NaCl 0,45-0,9%; б) повышается осмотическая устойчивость в интервале концентрации NaCl 0,09-0,4%. Включение в среду замораживания проникающих криопротекторов ДМСО или ДМСО+глюкозы значительно уменьшает выраженность изменений указанных осмотических свойств.

2. Замораживание и хранение эритроцитов в среде, содержащей декстран приводит к снижению содержания глутатиона в клетках при их отмывании от криоконсерванта. Дополнительное включение в среду ДМСО в концентрации 7% является достаточным для предотвращения уменьшения в клетках концентрации глутатиона.

3. В эритроцитах после замораживания и хранения в жидком азоте в среде с декстраном или с декстраном+ДМСО+глюкозой не обнаружено существенного повышения концентрации МДА.

4. lЭритроциты, отмытые после замораживания в комбинированной среде (декстран+ДМСО+глюкоза), представлены эхиноцитами и сфероэхиноцитами. В среде, содержащей альбумин, клетки преобразуются по форме и становятся дискоцитами с невысоким содержанием эхиноцитов.

Перспективы дальнейших исследований. В следующей работе планируется исследовать свойства эритроцитов, замороженных в среде с полиэтиленгликолем и диметилсульфоксидом.

Список литературы

1. Актуальные проблемы криобиологии / Ред: Пушкарь Н. С., Белоус А. М. – Киев: Наук. думка. 1981. – 608 С.
2. Ашмарин И. П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И. П. Ашмарин, И. П. Васильев, В. А. Амбросов. – Л.: Из–во Ленингр. Ун–та. 1975. – 76 С.
3. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М.: Наука. 1972. – 27°С.
4. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and resentadvancementon cryopreservation of different-type of tissues / J. Bakhach // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 119–126.
5. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods // Grune&Stratton, New York. – 1975. – 160 P.
6. Clark P. The influence of vehicle solutions on the toxicity of dimethyl sulfoxide to renal cortex / P. Clark, H. E. Hawkins, A. M. Karow // Cryobiology. – 1983. – Vol. 20, № 6. – P. 701.
7. Fahy G. M. Cryoprotectanttoxicity neutralizers reduce freezing domage / G. M. Fahy // Cryo–letters. – 1983. – Vol. 4, № 5. – P. 309–314.
8. Hoffman J. F. On the mechanism and measurementof shape transformations of constantvolume of human red blood cells / J. F. Hoffman // Blood Cells. – 1987. – Vol. 12, № 3. – P. 565–588.
9. Langer R. Lipid peroxidation and hemolysis in HES cryopreserved erythrocytes / R. Langer, T. Herold, H. A. Henrich // Beitr Infusionsther Transfusionsmed. – 1996. – Vol. 33. – P. 111–116.
10. Mazur P. Survival of frozen–thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose / P. Mazur, R. H. Miller // Cryobiology. – 1976. – Vol. 13, № 5. – P. 523–536.
11. Meryman H. T. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection / H. T. Meryman, R. J. Williams, M. S. Douglas // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, № 3. – P. 287–302.
12. Pawlak W. Effectof long term bed restin men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes / W. Pawlak, J. Kedziora, K. Zolynski, et. al. // J GravitPhysiol. – 1998. – Vol. 5, № 1. – P. 163–164.
13. Pellerin–Mendes C. In vitro study of the protective effectof trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin–Mendes, L. Million, M. Marchand–Arvier, et. al. //Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, № 2. – P. 173–186.
14. Throm M. J. Benzocaine–induced methemoglobinemia in two patients: interdisciplinary collaboration, management, and near misses / M. J. Throm, M. D. Stevens, C. Hansen // Pharmacotherapy. – 2007. – Vol. 27, № 8. – P. 1206–1214.
15. Ulrich J. M. Effectof a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant/ J. M. Ulrich, B. J. Finkle, P. H. Moore, H. Ginoza // Cryobiology. – 1979. – Vol. 16, № 6. – P. 550–556.

УДК 57. 043: 547. 42: 611. 018. 51

ВЛАСТИВОСТИ ЕРИТРОЦИТІВ, ЯКІ ЗАМОРОЖУВАЛИ У КОМБІНОВАНОМУ СЕРЕДОВИЩІ З ДЕКСТРАНОМ, ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСІДОМ ТА ГЛЮКОЗОЮ

Рамазанов В. В., Воловельська Е. Л., Коптелов В. О., Бондаренко В. А.

Резюме. В роботі досліджували антиоксидантні, осмотичні та морфологічні властивості еритроцитів, відмитих після заморожування та збереження у рідкому азоті (-196єС) у середовищі, що містить декстран, ДМСО та глюкозу, які були виготовлені у цукрозо-сольовому розчині. Встановлено, що після заморожування у середовищі, що містить декстран, еритроцити мають високу ступінь пошкодження, клітини, що залишилися, суттєво відрізняються від інтактних еритроцитів відносно осмотичних властивостей та втрачають значну кількість глутатіону при відмиванні кріоконсерванту. Включення у кріоконсервант ДМСО призводить до значного зниження ступеню пошкодження еритроцитів, попереджує зміну їх осмотичних властивостей та втрату глутатіону при відмиванні. Еритроцити, які були заморожені у середовищі, що містить декстран, ДМСО та глюкозу, мають задовільні антиоксидантні, осмотичні та морфологічні властивості. Отримані результати дозволяють припустити, що кріопротекторна ефективність даного комбінованого кріоконсерванту визначається надходженням у клітини ДМСО та глюкозы, та, внаслідок цього, послабленням гіпертонічного стресу на мембрани, який створюється концентруванням декстрану та цукрози при заморожуванні.

Ключові слова: еритроцити, кріопротектори, заморожування, антиоксидантні, осмотичні та морфологічни властивості.

УДК 57. 043: 547. 42: 611. 018. 51

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В СРЕДЕ С ДЕКСТРАНОМ, ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ И ГЛЮКОЗОЙ.

Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Коптелов В. А., Бондаренко В. А.

Резюме. В работе исследовали антиоксидантные, осмотические и морфологи-ческие свойства эритроцитов, отмытых после замораживания и хранения в жидком азоте (-196єС) в средах, содержащих декстран, ДМСО и глюкозу, приготовленных на сахарозо-солевой растворе. Показано, что после замораживания в среде с декстраном эритроциты имеют высокую степень повреждения, оставшиеся клетки по осмотическим свойствам существенно отличаются от интактных эритроцитов и теряют значительное количество глутатиона при отмывании криоконсерванта. Включение в криоконсервант ДМСО приводит к значительному снижению степени повреждения эритроцитов, предотвращает изменение их осмотических свойств и потерю глутатиона при отмывании. Эритроциты, замороженные в среде с декстраном, ДМСО и глюкозой, обладают удовлетворительными антиоксидантными, осмотическими и морфологическими свойствами. Полученные результаты позволяют предположить, что криопротекторная эффективность данного комбинированного криоконсерванта определяется поступлением в клетки ДМСО и глюкозы и, вследствие этого, ослаблением гипертонического стресса на мембраны, который создается концентрированием декстрана и сахарозы при замораживании.

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

UDC 57. 043: 547. 42: 611. 018. 51

Properties Of Erythrocytes Frozen In Medium With Dextran, Dimethyl Sulfoxide And Glucose

Ramaznov V. V., Volovelskaya Ye. V., Koptelov V. A., Bondarenko V. A.

Summary. In the research there were studied anti-oxidant, osmotic and morphological properties of erythrocytes washed outafter freezing and storage in liquid nitrogen (-196єС) in the media, containing dextran, DMSO and glucose, prepared with sugar-salines. Ithas been shown thatafter freezing in the medium with dextran the erythrocytes are strongly injured, the restof cells on osmotic properties significantly differ from intacterythrocytes and lose a big amountof glutathione during washing-outof a preservative. Inclusion of DMSO into a cryopreservative leads to a strong reduction of injury rate of erythrocytes, prevents the change in their osmotic properties and loss of glutathione during washing-out. The erythrocytes frozen in the medium with dextran, DMSO and glucose have satisfactory anti-oxidant, osmotic and morphological properties. The findings allows the supposition thatcryoprotective efficiency of this combined cryopreservative is determined by DMSO and glucose entering into cells and due to this weakening of hypertonic stress to membranes, resulted from concentration of dextran and sucrose when freezing.

Key words: erythrocytes, cryoprotectants, freezing, anti-oxidant, osmotic and morphological properties.

Стаття надійшла 19. 06. 2012 р.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.