Эффект "упаковки" при замораживании эритроцитов в комбинированных криоконсервантах

В.В. Рамазанов, В.А. Бондаренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

"Package" Effect under Erythrocyte Freezing with Combined Cryopreservatives

V.V. Ramazanov, V.A. Bondarenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В существующих методах замораживания эритроцитов применяется проникающий криопротектор глицерин, использование которого в высоких концентрациях требует трудоемкие подходы для его отмывания. Такая процедура приводит к значительной потере клеток и осмотическому повреждению оставшейся части клеток. Криоконсервирование эритроцитов с полимерными непроникающими криопротекторами может исключать процедуру их отмывания, однако после трансфузии клеток с такими криопротекторами выявляются лейкоцитоз, повышение концентрации гемоглобина и билирубина в плазме и задержка выведения данных криопротекторов из организма.

Использование комбинированных криоконсервантов с непроникающими и проникающими криопротекторами обеспечивает высокую сохранность функциональных свойств многих клеток после их замораживания: стволовых клеток периферической крови и костного мозга, гранулоцитов, лимфоцитов, гемопоэтических клеток кордовой крови, клеток поджелудочной железы человека.

Установлено, что использование криоконсервантов с непроникающими и проникающими криопротекторами сопровождается устранением эффекта «упаковки» (допол-нительных повреждений, связанных с высокой плот-ностью клеток в среде замораживания), повышением сохранности эритроцитов, поддержанием нормальной осмотической хрупкости и проницаемости ионов H^+ замороженных клеток.

На основе полученных результатов можно предположить, что блокирование развития повреждений, связанных с высокой плотностью эритроцитов, определяется ослаблением осмотического стресса, который создается концентрированием полимерных криопротекторов при замораживании. Включение в криоконсервант проникающего криопротектора оказывается эффективным подходом в отношении уменьшения осмотического стресса, создаваемого в ходе замораживания с непроникающими криопротекторами. Сочетание в криоконсерванте непроникаю-щих и проникающих криопротекторов обеспечивает новое криозащитное качество комбинированного состава, которое противодействует повреждающим факторам при замораживании-отогреве и сохраняет нормальные осмотические показатели для клеток пос-ле их отмывания.

Penetrative cryoprotectant glycerol, which usage in high concentrations requires the labour-intensive approaches for its washing-out, is applied in current methods of erythrocyte freezing. This procedure results in a significant cell loss and osmotic damage in the rest part of cells. Erythrocyte cryopreservation with polymer non-penetrative cryoprotectants may exclude the washing-out procedure, but after cell transfusion with such cryoprotectants there have been revealed the leukocytosis, increase in hemoglobin and bilirubin concentrations in plasm and a delay with these cryoprotectants release out an organism.

The usage of combined cryopreservatives with non-penetrative and penetrative cryoprotectants provides a high integrity of functional properties after freezing for many cells such as stem cells of peripheric blood and bone marrow, granulocytes, lymphocytes, cord blood hemopoietic cells, the ones of human pancreas.

The usage of cryopreservatives with non-penetrative and penetrative cryoprotectants was established as accompanying with the "package" effect elimination (additional damages, associated to a high cell density in freezing medium), an increase in erythrocyte integrity, the maintenance of normal osmotic fragility and H^+ ion permeability of frozen cells.

Basing on the results obtained we may assume that the blockage of damage development, related to a high erythrocyte density, is determined by weakening of osmotic stress, created by concentrating polymer cryoprotectants under freezing. Inclusion of penetrative cryoprotectant into cryopreservative occurs to be an efficient approach in respect of a decrease in osmotic stress, created during freezing with non-penetrative cryoprotectants. Combination of non-penetrative and penetrative cryoprotectants in a cryopreservative provides a new cryoprotective quality of a combined composition, which resists to damaging factors under freeze-thawing and preserves the normal osmotic indices for cells after their washing-out.