

Криопротекция полиэтиленгликолем и декстраном модифицированных эритроцитов

В.В. РАМАЗАНОВ, О.А. ОЛЕЙНИК, В.А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryoprotection of Modified Erythrocytes with Polyethylene Glycol and Dextran

V.V. RAMAZANOV, O.A. OLEJNIK, V.A. BONDARENKO

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

Исследовали влияние предварительной модификации цитоскелета на сохранность эритроцитов, замороженных с полиэтиленгликолем (ПЭГ) и декстраном, и на динамику их лизиса после ресуспендирования в изотонических средах с различными анионами (хлорид, сульфат, цитрат). Показали, что сохранность модифицированных эритроцитов после замораживания с ПЭГ выше по сравнению с декстраном. В то же время ресуспендирование размороженных эритроцитов в средах с различными анионами свидетельствует, что клетки, замороженные с ПЭГ, менее осмотически устойчивы, а кривые лизиса в средах с различными анионами менее отличаются между собой, чем с декстраном. Полученные результаты подтверждают, что декстран, по сравнению с ПЭГ, в большей степени удерживает развитие повреждений в мембранах при замораживании, инициируемых обработкой эритроцитов модификаторами цитоскелета.

Ключевые слова: эритроцит, замораживание, ПЭГ, декстран.

Досліджували вплив попередньої модифікації цитоскелета на схоронність еритроцитів, заморожених с поліетиленгліколем (ПЕГ) і декстраном, і на динаміку їхнього лізису після ресуспендування в ізотонічних середовищах з різними аніонами (хлорид, сульфат, цитрат). Показали, що схоронність модифікованих еритроцитів після заморожування з ПЕГ вище в порівнянні з декстраном. Ресуспендування розморожених еритроцитів у середовищах з різними аніонами свідчить, що клітини, заморожені з ПЕГ, менш осмотично стійкі, а криві лізису в середовищах з різними аніонами менш різняться між собою, ніж з декстраном. Отримані результати свідчать про те, що декстран, у порівнянні з ПЕГ, більше стримує розвиток ушкоджень у мембранах при заморожуванні, що ініціюються обробкою еритроцитів модифікаторами цитоскелета.

Ключові слова: еритроцит, заморожування, ПЕГ, декстран.

There was investigated the effect of preliminary cytoskeletal modification on the integrity of erythrocytes, frozen with polyethylene glycol (PEG) and dextran, as well as on dynamics of their lysis after resuspending in isotonic media with different anions (chloride, sulfate, citrate). Integrity of modified erythrocytes after freezing with PEG was shown to be higher if comparing with dextran. At the same time resuspension of frozen-thawed erythrocytes in the media with different anions testifies to the fact, that cells, frozen with PEG are less osmotically resistant and lysis curves in the media with various anions are less different than with dextran. The results obtained confirm, that dextran, in comparison with PEG in a greater extent retains the development of damages in membranes during freezing, which are initiated by erythrocyte treatment with cytoskeletal modifiers.

Key-words: erythrocyte, freezing, PEG, dextran.

В растворе молекулы ПЭГ и декстранов при контакте с поверхностью образуют специфическую межфазную структуру, состоящую из адсорбированного и истощенного слоев полимера, толщина которых определяется молекулярной массой, концентрацией полимера и температурой раствора [12]. Исследование влияния температуры на взаимодействие белков с криопротектором показало, что стабилизация белков при снижении температуры определяется исключением криопротекторов из гидратной оболочки белков [9].

Уменьшение связывания ПЭГ-1500 с эритроцитами при снижении температуры консерванта создает положительный эффект для поддержания структуры цитоскелета, морфологии и сохранности клеток после замораживания [1]. Использование

In solution PEG and dextran molecules when contacting with surface form specific interphase structure, comprising adsorbed and exhausted polymer layers, which thickness is determined by molecular mass, polymer concentration and solution temperature [12]. Studying the temperature effect on interaction of proteins with a cryoprotectant demonstrated, that protein stabilisation at temperature decrease was determined by excluding cryoprotectants from protein hydrate membrane [9].

Reduction of PEG-1500 binding with erythrocytes at a decrease in preservative temperature causes a positive effect to maintain the structure of cytoskeleton, morphology and integrity of cells after freezing [1]. Even if dextran usage in 30% concentration causes a positive effect on cell morphology, osmotic fragility of

Адрес для корреспонденции: Рамазанов В.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Ramazanov V.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

декстрана в 30%-й концентрации, хотя и оказывает положительное влияние на морфологию клеток, однако осмотическая хрупкость отмытых после замораживания эритроцитов значительно отличается от нормального поведения [13], что указывает на существенное повреждение мембраны и цитоскелета. Замораживание с гидроксипропилкрахмалом изменяет взаимодействия белков цитоскелета и вызывает потерю мембранами части спектрина [18]. Модификация взаимодействий между белками цитоскелета приводит к значительной потере чувствительности клеток к холодному и гипертоническому шоку [4], тогда как к постгипертоническому лизису она повышается [3].

Цель работы – сравнить криопротекторные свойства ПЭГ и декстрана при замораживании модифицированных эритроцитов. Как выяснилось, модификация цитоскелета приводит к значительной потере устойчивости клеток к замораживанию с полимерами и, следовательно, используемые в экспериментах обработки повышают чувствительность клеток к замораживанию и к лизису после ресуспендирования. Тем не менее анализ сохранности клеток после ресуспендирования в изотонических средах с различными анионами позволяет сравнить криопротекторные свойства двух различных полимеров.

Материалы и методы

В работе использовали соли NaCl, Na₂SO₄, Натрий лимонно-кислый трёхзамещённый, а также сахарозу марки “чда”, ПЭГ-2000 (Merck) и декстран-35 с молекулярной массой 35000-50000 (Serva), йодоацетамид (ЙАА) производства Serva, парахлормеркурийбензоат (ПХМБ) производства Sigma. Эритроциты человека получали из донорской крови четырехкратным отмыванием раствором с 0,15 М NaCl, 10 мМ трис, pH 7,6. Клетки с 20%-м гематокритом в среде, содержащей 90 мМ KCl, 45 мМ NaCl, 44 мМ сахарозы, 10 мМ трис, pH 7,6, обрабатывали геминном (300 мкМ) при 37°C, время инкубации 10 мин [4]. Обработка ЙАА проводилась 15 мин с добавлением ПХМБ до конечной концентрации 1 мМ, время инкубации 60 мин [6] с последующим отмыванием средой обработки (3 раза) и средой отмывания (2 раза). Осадки эритроцитов смешивали со средой замораживания (20% ПЭГ или декстрана), приготовленной на растворе, содержащем 50 мМ NaCl, 200 мМ сахарозы, 10 мМ трис, pH 7,6. Образцы с объемом суспензии 1 мл замораживали погружением в жидкий азот, выдерживали 15 мин и размораживали на водяной бане (40°C) в течение 3-х минут. Размороженную суспензию разводили средой замораживания и центрифугировали для выявления степени гемолиза в надосадке. Для

erythrocytes, washed-out after freezing considerably differs from normal behavior [13], that indicates to a considerable damage in membrane and cytoskeleton. Freezing with hydroxyethylstarch changes interactions of cytoskeletal proteins and causes a loss of spectrin part by membranes [18]. Modification of interactions between cytoskeletal proteins results in a considerable loss of cell sensitivity to cold and hypertonic shock [4], meanwhile it increases to post-hypertonic lysis [3].

The work was aimed to compare cryoprotective properties of PEG and dextran during modified erythrocytes freezing. Cytoskeletal modification was found out to result in a considerable loss of cell resistance to freezing with polymers and, consequently, the treatments used in the experiments increase cell sensitivity to freezing and lysis after resuspending. However, the analysis of cell integrity after resuspending in isotonic media with different anions enables to compare cryoprotective properties of two different polymers.

Materials and methods

In the work we used such salts as: NaCl, Na₂SO₄, tri-sodium citrate, sucrose with “pure for analysis” grade, PEG-2000 (Merck), dextran-35 with 35000-50000 molecular mass (Serva), iodoacetamide (IAA) (Serva), parachloromercuribenzoate (PCMB) (Sigma). Human erythrocytes were procured from donor blood by fourfold washing-out with the solution, containing 0.15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7.6. Cells with 20% hematocrit in the medium with 90 mM KCl, 45 mM NaCl, 44 mM sucrose, 10 mM Tris, pH 7.6 were hemin-treated (300 μM) at 37°C with 10 min incubation time [4]. IAA treatment duration was 15 min with following adding PCMB up to 1 mM final concentration, incubation time was 60 min [6] with following washing-out with treatment medium (thrice) and washing-out medium (twice). Erythrocyte sediments were mixed with freezing medium (20% PEG or dextran), prepared with the solution, contained 50 mM NaCl, 200 mM sucrose, 10 mM Tris, pH 7.6. Samples with 1 ml suspension volume were frozen by immersing into liquid nitrogen, exposed for 15 min and thawed on water bath (40°C) during 3 min. Frozen-thawed suspension was diluted with freezing medium and centrifuged for revealing the hemolysis extent in supernatant. In order to determine the erythrocyte resistance to resuspension, 50 ml of frozen-thawed suspension was transferred into isotonic medium of 1ml volume, exposed up to 60 min, then centrifuged and the hemolysis extent was calculated by the formula:

$$H = \left[1 - \frac{A}{B} \right] \times 100,$$

where A is a part of residual at resuspension; B is a part of residual after freeze-thawing.

определения устойчивости эритроцитов к ресуспендированию 50 мкл размороженной суспензии переносили в изотоническую среду объемом 1 мл и выдерживали до 60 мин, центрифугировали и степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\Gamma = \left[1 - \frac{A}{B} \right] \times 100,$$

где А – доля остатка при ресуспендировании; В – доля остатка после размораживания.

Повреждение эритроцитов при постгипертоническом лизисе или ресуспендировании после замораживания связано с входом в клетки ионов натрия и хлорида. Хлоридный анион обладает высокой проницаемостью и не ограничивает поступление катионов натрия в клетку. Замена хлорида на менее проникающий или непроникающий анион должна задерживать поступление катионов в клетку, если мембрана не будет иметь значительные повреждения, проницаемые для анионов по Стоксовскому радиусу, превышающие хлоридный анион [2]. С учетом этого в экспериментах при ресуспендировании использовали изотонические среды, содержащие 0,15 М NaCl; 0,1 М Na₂SO₄; 0,1 М Na-цитрат; 0,3 М сахарозы, приготовленные на 10 мМ трис-буфере (pH 7,6).

Результаты и обсуждение

Модификация эритроцитов гемином не вызывает значительного повреждения клеток после замораживания в растворах с ПЭГ, а с декстраном отмечается существенная разница между сохранностью нормальных и модифицированных эритроцитов (рис. 1). Обработка клеток ЙАА+ПХМБ снижает устойчивость после замораживания, однако сохранность при использовании ПЭГ выше и составляет 79-83%, с декстраном – 55-65%. Лизис после ресуспендирования в изотонических средах после замораживания в растворах, содержащих ПЭГ, несколько выше, чем декстрана (рис. 2). При ресуспендировании эритроцитов, модифицированных гемином, гемолиз возрастает как для эритроцитов, замороженных в средах с ПЭГ, так и с декстраном, однако степень лизиса менее зависит от вида аниона для клеток, замороженных с ПЭГ, чем с декстраном (рис. 3). Обработка эритроцитов ЙАА+ПХМБ приводит к ещё большему повышению уровня лизиса при ресуспендировании эритроцитов, замороженных с ПЭГ, выраженность между кривыми лизиса которых в изотонических средах с различными анионами уже не проявляется (рис. 4, а). В то же время указанная модификация незначительно повышает лизис при ресуспендировании эритроцитов, замороженных с декстраном, и остаются различия между кривыми лизиса с различными

Erythrocyte damage at post-hypertonic lysis or resuspension after freezing is related to sodium and chloride ion incoming into cells. Chloride anion has a high permeability and does not limit sodium cation incoming into a cell. Replacing chloride by less penetrative or non-penetrative anion should retain cation entering into a cell, if membrane is not significantly damaged because of those permeable for anions by Stoksowsky radius, exceeding chloride anion [2]. Taking into account this fact, the isotonic media, containing 0.15 M NaCl; 0.1 M Na₂SO₄; 0.1 M Na-citrate; 0.3 M sucrose, prepared on 1 mM Tris-buffer (pH 7.6) were used in the experiments at resuspension.

Results and discussion

Hemin-modification of erythrocytes does not cause a significant cell damage after freezing in solutions with PEG, but there is a considerable difference between the integrity of normal and modified erythrocytes (Fig. 1). IAA+PCMB cell treatment reduces the resistance after freezing, but when using PEG the integrity makes 79-83 and 55-65% for dextran. Lysis after resuspension in isotonic media after freezing in PEG-contained solutions is slightly higher, than in dextran-contained ones (Fig. 2). When resuspending hemin-modified erythrocytes, hemolysis increases for both erythrocytes, frozen in media with PEG and dextran, however lysis extent less depends on anion type for cells, frozen with PEG than with dextran (Fig. 3). IAA+PCMB erythrocyte treatment results in much greater augmentation of lysis level when resuspending erythrocytes, frozen with PEG, where manifestation rate between lysis curves in isotonic media with different anions has not manifested yet (Fig. 4, a). At the same time the mentioned modification not so significantly increases lysis when resuspending dextran-frozen erythrocytes and the differences between lysis curves with different anions (Fig. 4, b) as well as for hemin-treated erythrocytes (Fig. 3, b) are kept.

Thus, significant differences of PEG and dextran effect on the integrity of pre-modified frozen erythrocytes, are revealed. Differences in protection, revealed after freeze-thawing (see Fig. 1) and after transferring into isotonic media (Fig. 2-4) testify to better protection with PEG and dextran, correspondingly. Such contradiction can be explained by more manifested PEG capability to hide damages development during freeze-thawing cycle, initiated by mentioned modifications, which are manifested during cell resuspension in isotonic media. The situation is quite opposite when using dextran and less manifested hemolysis development at resuspension confirms higher cryoprotective properties of this polymer.

It was mentioned previously to apparent cryoprotective properties of polymers [19], related to a

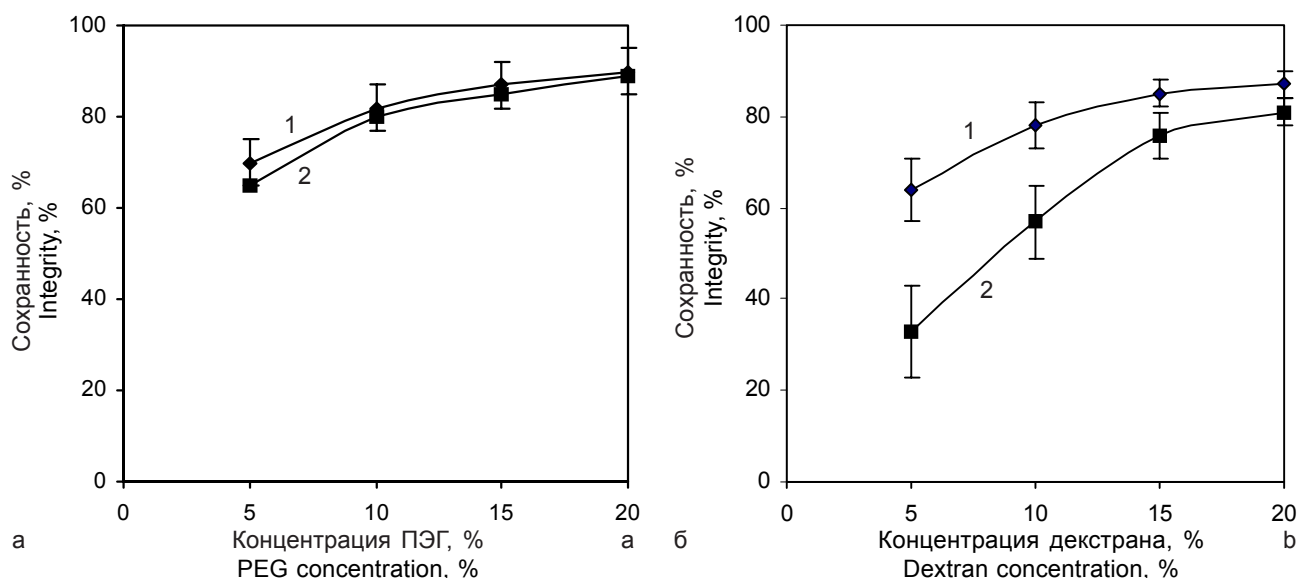


Рис. 1. Сохранность эритроцитов после замораживания в присутствии различных концентраций ПЭГ (а) или декстрана (б); 1 – контрольные эритроциты; 2 – эритроциты, обработанные гемином.

Fig. 1. Erythrocyte integrity after freezing at the presence of different concentrations of PEG (a) or dextran (b): 1 – control erythrocytes; 2 – hemin-treated ones.

анионами (рис. 4, б) как и для эритроцитов, обработанных гемином (см. рис. 3, б).

Таким образом, выявляются существенные различия влияния ПЭГ и декстрана на сохранность замороженных эритроцитов, которые были предварительно модифицированы. Отличия в протекции, выявляемые после размораживания (см. рис. 1), свидетельствуют о лучшей протекции с ПЭГ, а после перенесения в изотонические среды (рис. 3, 4) – с декстраном. Такое противоречие можно объяснить более выраженной способностью ПЭГ скрывать развитие повреждений в цикле замораживания-оттаивания, инициируемых указанными модификациями, которые выявляются при ресуспендировании клеток в изотонических средах. При использовании декстрана ситуация противоположная, а менее выраженное развитие гемолиза при ресуспендировании подтверждает лучшие криопротекторные свойства данного полимера.

Указывалось на кажущиеся криопротекторные свойства полимеров [19], связанные со снижением поверхностной энергии растворов криопротекторов, которая становится ниже, чем у раствора гемоглобина. На поверхности поврежденных клеток полимеры образуют устойчивую интерфазу, которая создает не только протекторный эффект, но и скрывает мембранные дефекты, через которые гемоглобин не может легко проходить. Однако ПЭГ по сравнению с декстраном не обладает достаточным потенциалом, снижающим поверхностную энергию раствора при повышении его концентрации [19]. Такой факт находится в противоречии с результатом настоящей работы, так как ПЭГ в большей степени, чем декстран скрывает повреждения эритроцитов, которые

decrease in surface energy of cryoprotectant solution, which became lower than in hemoglobin solution. On a surface of damaged cells polymers form a resistant interphase, which creates not only a protective effect but hides membrane defects, through which hemoglobin can not easily pass. But PEG in comparison with dextran does not have a sufficient potential, decreasing a surface energy of solution with an increase of its concentration [19]. Such a fact contradicts this work results, because PEG in a greater extent than dextran hides erythrocyte damages, manifesting only during resuspension. It proceeds that PEG has a damaging effect at its desorption from cell surface due to erythrocyte resuspension.

Cryoprotectants interact with membranes via hydrophobic contacts or hydrogen bonds with phospholipid heads. Under freezing conditions cryoprotectant should be bound with lipid bilayer for maintaining its integrity. However it is not clear which of two mentioned interactions is more resistant and important under cryoprotective conditions [8]. According to existing notions, polymers are sorbed on cell surface, by changing glycocalyx packing. Effects on lipid bilayer can be mediated by decreasing dielectric constant, by strengthening cell surface hydrophobicity and phospholipid dehydration [7, 11]. In this connection permeability increase for Ca^{2+} and fusion of liposomes and erythrocytes at PEG presence occur by the same mechanism as a result of dehydration and formation of membrane local damages [7]. Change in polymorphous state of bilayer is supposed to be a reason for PEG antilytic effect on liposomes at melittin presence [16].

According to the data [13, 14] the used in freezing media dextran concentrations are within the range of

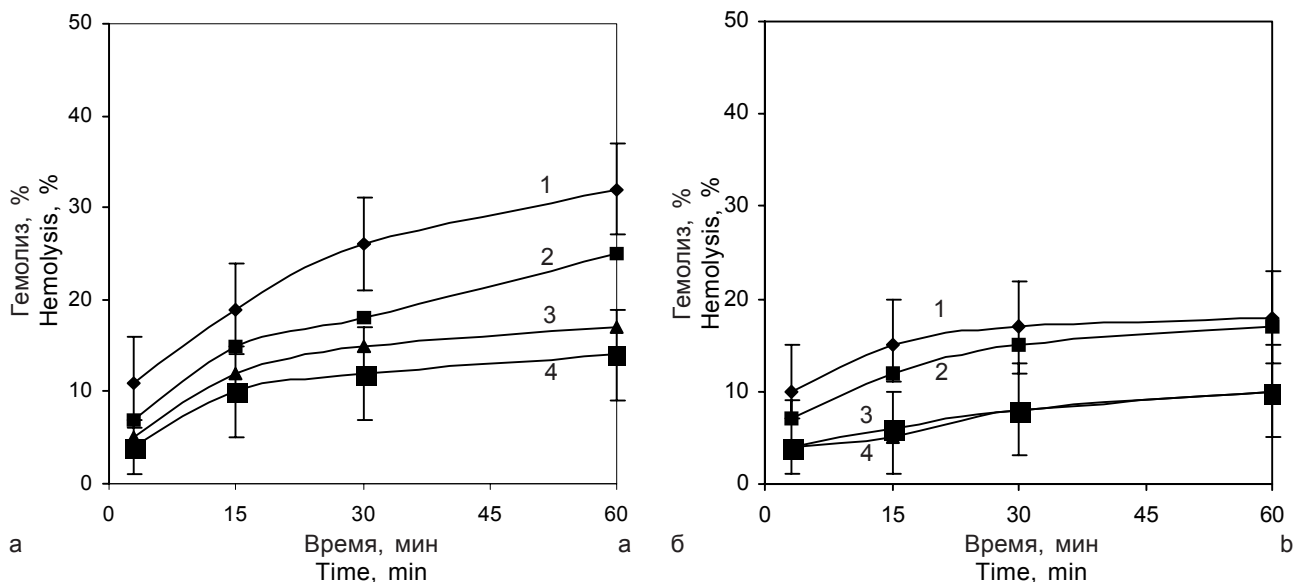


Рис. 2. Лизис размороженных эритроцитов после замораживания в присутствии 20%-го ПЭГ (а) или 20%-го декстрана (б) после ресуспендирования в изотонических средах: 1 – 0,15 М NaCl; 2 – 0,1 М Na₂SO₄; 3 – 0,1 М Na-цитрат; 4 – 0,3 М сахарозы.

Fig. 2. Lysis of frozen-thawed erythrocytes at the presence of of 20% PEG (a) or 20% dextran (b) after resuspending in isotonic media: 1 – with 0.15 M NaCl; 2 – 0.1 M Na₂SO₄; 3 – 0.1 M sodium citrate; 4 – 0.3 M sucrose.

выявляются только при ресуспендировании. Из этого следует, что ПЭГ обладает повреждающим действием при его десорбции от поверхности клетки вследствие ресуспендирования эритроцитов.

Криопротекторы взаимодействуют с мембранами за счет гидрофобных контактов или водородных связей с головками фосфолипидов. В условиях замораживания криопротектор должен оставаться связанным с липидным бислоем, чтобы поддерживать его целостность. Однако неясно, какое из двух указанных взаимодействий устойчивее и важнее в условиях криопротекции [8]. По сложившимся представлениям, полимеры сорбируются на поверхности клетки, изменяя упаковку гликокаликса. Воздействия на липидный бислой могут быть опосредованы снижением диэлектрической константы, усилением гидрофобности поверхности клеток и дегидратацией фосфолипидов [7, 11]. В связи с этим повышение проницаемости для Ca²⁺ и слияние липосом и эритроцитов в присутствии ПЭГ происходят по одному механизму вследствие дегидратации и образования локальных повреждений мембран [7]. Полагают, что изменение полиморфного состояния бислоя является причиной антилитического действия ПЭГ на липосомы в присутствии меллитина [16].

Согласно данным [13, 14], используемые концентрации декстрана в средах замораживания находятся в интервале 5-40%, но его оптимальное количество остаётся под вопросом. Использование высоких концентраций декстрана нежелательно из-за дополнительного приращения осмотического

5-40%, but its optimal amount remains unclear. However the usage of high dextran concentrations is unwanted due to an additional increment of osmotic gradient [14]. Erythrocytes, frozen in 30% dextran-contained medium have satisfactory morphological index, but the behavior of osmotic fragility curve considerably deviates of the normal one [13]. A decrease in osmotic resistance of erythrocytes at salt concentrations, close to isotonic ones, indicates to membrane and cytoskeletal damages.

The question arises if the disorders in cytoskeleton similar to those, formed during erythrocyte modification by hemin or IAA+PCMB, can occur during freezing. Hemin easily penetrates through erythrocyte membrane, binds with cytoskeletal proteins (band 4.1, actin, spectrin), that results in their dissociation and following membrane destruction. If bonds in cytoskeleton are partially modified, cytoskeleton is capable to maintain membrane structure, however such cytoskeleton-membrane complex is mechanically slightly stable [17]. Hemin treatment results in an increase in osmotic fragility, considerable loss of erythrocyte sensitivity to cold and hypertonic shock [4], an increase in sensitivity to post-hypertonic lysis [3]. At the same time IAA+PCMB erythrocyte treatment slightly increases sensitivity to cold and hypertonic shock [5] and does not change it to post-hypertonic lysis [3]. This treatment eliminates DIDS effect on cold and hypertonic shock. This enables to suppose that the inhibitor effect is mediated by band 3 protein-cytoskeleton bond [5, 6]. At the mentioned modification PCMB is bound in a hydrophobic fragment of band 3 protein inside a membrane, at the same time there is a change in conformation of

градиента [14]. Эритроциты, замороженные в среде, содержащей 30% декстрана, имеют удовлетворительный морфологический показатель, но поведение кривой осмотической хрупкости существенно отклоняется от нормального [13]. Снижение осмотической устойчивости эритроцитов при концентрациях соли, близких к изотоническим, указывает на повреждения мембраны и цитоскелета.

Возникает вопрос, могут ли при замораживании происходить нарушения в цитоскелете, подобные тем, которые образуются при модификации эритроцитов геминном или ЙАА+ПХМБ. Гемин свободно проникает через мембрану эритроцитов, связывается с белками цитоскелета (полоса 4.1, актин, спектрин), что приводит к диссоциации их и последующей деструкции мембраны. Если связи в цитоскелете модифицируются частично, то цитоскелет способен поддерживать структуру мембраны, однако такой цитоскелет-мембранный комплекс является механически слабо стабильным [17]. Обработка геминном приводит к повышению осмотической хрупкости, значительной потере чувствительности эритроцитов к холодовому и гипертоническому шоку [4], повышению чувствительности к постгипертоническому лизису [3]. В то же время обработка эритроцитов ЙАА+ПХМБ несколько увеличивает чувствительность к холодовому и гипертоническому шоку [5] и не изменяет к постгипертоническому лизису [3]. Данная обработка снимает действие ДИДС на холодовой и гипертонический шок. Это позволило предположить, что действие ингибитора опосредуется связью белок полосы 3-цитоскелет [5,6]. При указанной модификации ПХМБ связывается в гидрофобном фрагменте белка полосы 3 внутри мембраны, при этом изменяется конформация цитоплазматической части данного белка, который теряет способность связываться с анкирином [10]. Длительная обработка с ПХМБ приводит к везикуляции мембраны [10,15]. Данные [1, 13, 18] свидетельствуют о том, что при замораживании изменяются морфологические и реологические свойства, связанные с модификацией структуры цитоскелета и потерей части его белков. При модификации геминном мембраны эритроцитов также теряют некоторые белки, тогда как при обработке ЙАА+ПХМБ, они не только удерживают все основные белки, но и приобретают свойства сорбировать дополнительные из цитоплазмы [6]. Поскольку мембрана и цитоскелет являются основной мишенью повреждений при замораживании, то, очевидно, места взаимодействия цитоскелета с мембраной будут наиболее уязвимыми точками влияния повреждающих факторов [3-6].

cytoplasmic part of this protein, which loses the property to be bound with ankyrin [10]. Long-term PCMB treatment results in membrane vesiculation [10, 15]. Data in the papers [1, 13, 18] testify to the fact that during freezing there are the changes in morphological and rheologic properties, related to modification of cytoskeletal structure and a loss of its proteins part. Under hemin modification erythrocyte membranes lose also some proteins, meanwhile during IAA+PCMB treatment they not only retain all main proteins but get the properties to sorb additional ones from cytoplasm [6]. Since membrane and cytoskeleton are the main target of damages during freezing [1, 13, 18], evidently, the places of interaction of cytoskeleton

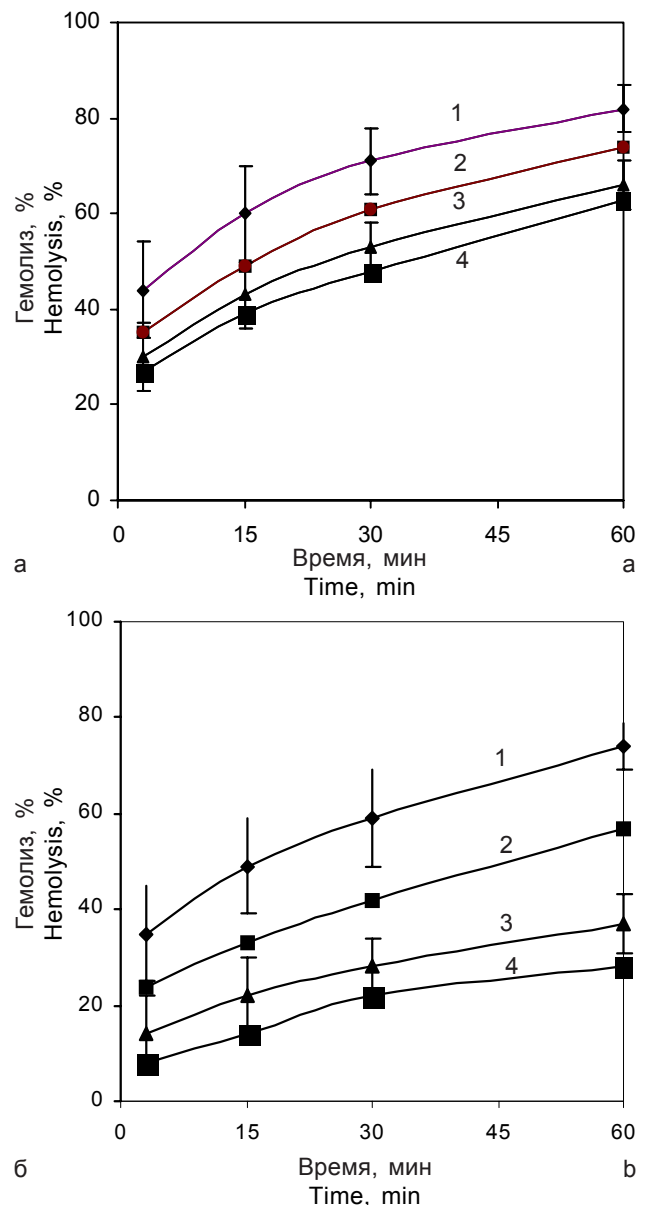


Рис. 3. Влияние обработки геминном на лизис ресуспендированных эритроцитов. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 3. Effect of hemin treatment on lysis of resuspended erythrocytes. The same legends as in Fig. 2.

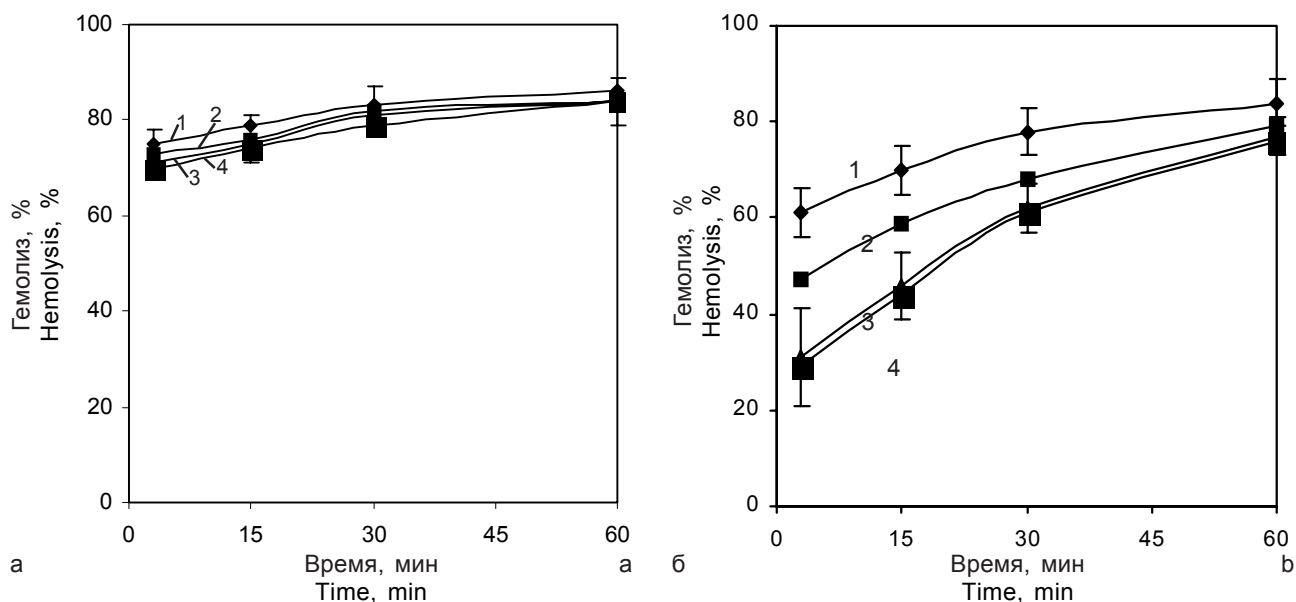


Рис. 4. Влияние обработки ЙАА+ПХМБ на лизис ресуспендированных эритроцитов. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 4. Effect of IAA+PCMB treatment on lysis of resuspended erythrocytes. The same legends as in Fig. 2.

Выводы

Анализ литературных данных позволяет сделать некоторые предположения относительно различий в криопротекторных и повреждающих действиях ПЭГ и декстрана на мембрану при замораживании эритроцитов. Кажущееся более выраженное протекторное действие ПЭГ по сравнению с декстраном в цикле замораживания-оттаивания определяется существованием особой интерфазы в условиях дегидратации, повышения гидрофобности и изменения полиморфного состояния липидов мембраны. В этой ситуации адсорбированный слой ПЭГ образует с мембраной комплекс, более устойчивый к низким температурам, чем с декстраном. Однако при замораживании-оттаивании такой комплекс ПЭГ с мембраной приобретает свойство единого образования, а десорбция полимера при ресуспендировании становится повреждающей процедурой. Менее выраженное развитие повреждений при ресуспендировании модифицированных эритроцитов, замороженных с декстраном, по сравнению с ПЭГ, свидетельствует о том, что декстран в большей степени способен предупреждать развитие повреждений как от нарушений взаимодействий между белками цитоскелета (обработка геминном), так и от модификации взаимодействия цитоскелета с мембраной (обработка ЙАА+ПХМБ).

Литература

1. Бабийчук Л.А. Землянских Н.Г. Влияние полиэтиленоксида-1500 и температуры на особенности моди-

with membrane will be the most vulnerable points for damaging factor effect [3-6].

Conclusions

Analysis of literature data enables assuming about differences in PEG and dextran cryoprotective and damaging effects on membrane during erythrocyte freezing. Apparent more manifested protective effect of PEG in comparison with dextran in freeze-thawing cycle is determined by the presence of special interphase under dehydration conditions, an increase in hydrophobicity and change in polymorphous state of membrane lipids. In this situation PEG adsorbed layer forms with membrane more resistant complex to low temperatures than in case with dextran. However during freeze-thawing such PEG-membrane complex gets the property of integrated formation, and polymer desorption at resuspension becomes a damaging procedure. Less manifested development of damages when resuspending modified erythrocyte, frozen with dextran, in comparison with PEG testifies to the fact, that dextran in a greater extent is capable to prevent damages development, proceeding from disorder in interactions between cytoskeletal proteins (hemin treatment), as well as from modification of cytoskeletal interaction with membrane (IAA+PCMB treatment).

References

1. Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G. Effect of polyethylene oxide-1500 and temperature on modification peculiarities of erythrocyte membranes // Problems of Cryobiology.– 1996.– N4.– P. 32-38.

- фикации мембран эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– №4.– С.32-38.
2. Олейник О.А., Абу Аль Асаль Ф., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Влияние различных анионов на постгипертонический лизис эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 22-31.
 3. Олейник О.А., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Постгипертонический лизис модифицированных эритроцитов в цитратной среде // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 21-30.
 4. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Действие гемина и ДИДС на холодной и гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С. 13-17.
 5. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Сравнительное исследование холодого и гипертонического шока эритроцитов в растворе NaCl // Пробл. криобиологии.– 1996.– №1.– С. 34-37.
 6. Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Воловельская Е.Л. и др. Влияние прочности связи периферических белков с мембранами на гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии.–1996.– №3.– С.8-12.
 7. Aldwinckle T.J., Ahkong Q.F., Bangham A.D. et al. Effect of poly(ethylene glycol) on liposomes and erythrocytes. Permeability changes and membrane fusion // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– Vol. 689, N3.– P. 548-560.
 8. Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology.– 1987.– Vol. 24, N4.– P. 324-331.
 9. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N4.– P. 401-415.
 10. Clark S.J., Ralston G. B. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membrane brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– Vol. 1021, N2.– P. 141-147
 11. Herrmann A., Pratsch L., Arnold H., Lassmann G. Effect of poly(ethylene glycole) on the polarity of aqueous solutions and on the structure of vesicle membranes // Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol. 733, N1.– P. 87-94.
 12. Neu B., Meiselman H.J. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions // Biophys. J.– 2002.– Vol. 83, N5.– P. 2482-2490.
 13. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // Cryobiology.– 1997.– Vol. 35, N2.– P. 173-86.
 14. Pribor D.B., Pribor. H.C. Studies with dextran 40 in cryopreservation of blood // Cryobiology.– 1973.– Vol.10, N2.– P.93-103.
 15. Ralston G. B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 649, N1.– P. 98-104.
 16. Rex S., Bian J., Silvius J.R., Lafleur M. The presence of PEG-lipids in liposomes does not reduce melittin binding but decreases melittin-induced leakage // Biochim. Biophys. Acta.– 2002.– Vol. 1558, N2.– P. 211-221.
 17. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat.– 1986.– Vol. 3, N3.– P. 467-477.
 18. Singbartl K., Langer R., Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes // Cryobiology.– 1998.– Vol. 36, N2.– P.115-123.
 19. Williams R.J. The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N5.– P. 521-526.
 2. Olejnik O.A., Abu Al Asal F., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Effect of various anions on post-hypertonic lysis of erythrocytes // Problems of Cryobiology.– 2003.– N2.– P. 22-31.
 3. Olejnik O.A., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Post-hypertonic lysis of modified erythrocytes in citrate medium // Problems of Cryobiology.– 2003.– N3.– P. 21-30.
 4. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Hemin and DIDS effect on cold and hypertonic shock of erythrocytes // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2.– P. 13-17.
 5. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Comparative study of cold and hypertonic shock of erythrocytes in NaCl solution // Problems of Cryobiology.– 1996.– N1.– P. 34-37.
 6. Ramazanov V.V., Semenchenko A.Yu., Volovelskaya E.L. et al. Effect of stability of peripheric protein bond with membranes on erythrocyte hypertonic shock // Problems of Cryobiology.– 1996.– N3.– P. 8-12.
 7. Aldwinckle T.J., Ahkong Q.F., Bangham A.D. et al. Effect of poly(ethylene glycol) on liposomes and erythrocytes. Permeability changes and membrane fusion // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– Vol. 689, N3.– P. 548-560.
 8. Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // Cryobiology.– 1987.– Vol. 24, N4.– P. 324-331.
 9. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N4.– P. 401-415.
 10. Clark S.J., Ralston G. B. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membrane brought about by p-mercuribenzenesulfonate // Biochim. Biophys. Acta.– 1990.– Vol. 1021, N2.– P. 141-147
 11. Herrmann A., Pratsch L., Arnold H., Lassmann G. Effect of poly(ethylene glycole) on the polarity of aqueous solutions and on the structure of vesicle membranes// Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– Vol. 733, N1.– P. 87-94.
 12. Neu B., Meiselman H.J. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions // Biophys. J.– 2002.– Vol. 83, N5.– P. 2482-2490.
 13. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // Cryobiology.– 1997.– Vol. 35, N2.– P. 173-86.
 14. Pribor D.B., Pribor. H.C. Studies with dextran 40 in cryopreservation of blood // Cryobiology.– 1973.– Vol.10, N2.– P.93-103.
 15. Ralston G. B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– Vol. 649, N1.– P. 98-104.
 16. Rex S., Bian J., Silvius J.R., Lafleur M. The presence of PEG-lipids in liposomes does not reduce melittin binding but decreases melittin-induced leakage // Biochim. Biophys. Acta.– 2002.– Vol. 1558, N2.– P. 211-221.
 17. Shaklai N., Avissar N., Rabizaden E., Shaklai M. Disintegration of red cell membrane cytoskeleton by hemin // Biochem. Internat.– 1986.– Vol. 3, N3.– P. 467-477.
 18. Singbartl K., Langer R., Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes // Cryobiology.– 1998.– Vol. 36, N2.– P.115-123.
 19. Williams R.J. The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N5.– P. 521-526.

Accepted in 30.11.2004

Поступила 30.11.2004