

Морфологические изменения эритроцитов животных после криоконсервирования

UDC 591.111.1:615.014.41

O.N. DENISOVA¹, L.G. KULESHOVA^{2*}, N.G. ZEMLYANSKIKH², L.A. BABIYCHUK², G.F. ZHEGUNOV¹**Post-Thaw Morphological Changes in Animal Erythrocytes**

В работе методом световой микроскопии исследованы морфологические изменения эритроцитов лошади, быка и собаки при взаимодействии с 20%-м раствором диметилсульфоксида (ДМСО) и 30%-м раствором полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500), а также после криоконсервирования клеток в присутствии указанных криопротекторов. Установлено, что деконсервированные эритроциты всех видов животных под влиянием проникающего криопротектора ДМСО трансформируются в эхиноциты, а непроникающего ПЭО-1500 – в стоматоциты. Проанализировано состояние деконсервированных эритроцитов животных при переносе их в физиологические условия.

Ключевые слова: эритроциты животных, криопротектор, стоматоциты, эхиноциты.

У роботі методом світлової мікроскопії досліджено морфологічні зміни еритроцитів коня, бика, собаки при взаємодії з 20%-м розчином диметилсульфоксиду (ДМСО) та 30%-м розчином поліетиленоксиду з молекулярною масою 1500 (ПЕО-1500), а також після криоконсервування клітин у присутності зазначених криопротекторів. Доведено, що деконсервовані еритроцити усіх видів тварин під впливом проникаючого криопротектора ДМСО трансформуються у ехіноцити, а непроникаючого ПЕО-1500 – у стоматоцити. Проаналізовано стан деконсервованих еритроцитів тварин при переносі їх у фізіологічні умови.

Ключові слова: еритроцити тварин, криопротектор, стоматоцити, ехіноцити.

Morphological changes in equine, bovine, and canine erythrocytes, when interacting with 20% dimethylsulfoxide (DMSO) and 30% polyethylene oxide with molecular mass of 1500 (PEO-1500) solutions, as well as after cell cryopreservation at the presence of the mentioned cryoprotectants have been studied in this research using light microscopy. Frozen-thawed erythrocytes of all animal species were established to be transformed into echinocytes under DMSO penetrative cryoprotectant effect and into stomatocytes under a non-penetrative one. The state of animal frozen-thawed erythrocytes when transferring them into physiological conditions was analysed.

Key-words: animal erythrocytes, cryoprotectant, stomatocytes, echinocytes.

Функциональную полноценность эритроцитов определяют морфологические, биохимические и физиологические показатели. Под влиянием различных факторов (состав и тоничность среды, механические воздействия, патологические процессы в организме и т. д.) эритроциты утрачивают свою нативную форму [3]. Мембрана эритроцита – звено, которое воспринимает и реагирует на внешние воздействия, а форма эритроцита – индикатор изменений в мембране. Сохранение морфологической целостности эритроцитов после криоконсервирования может свидетельствовать о достаточном уровне обменных процессов, сохранности, нормальном функционировании клеток. Эритроциты млекопитающих имеют структурные и морфологические особенности. Поэтому изучение специфики реакций эритроцитов на действие низких температур является актуальной задачей криобиологии.

Цель работы – исследовать особенности трансформации эритроцитов лошади, быка и собаки

Functional integrity of erythrocytes is determined by morphological, biochemical and physiological indices. Under the effect of various factors (medium composition and tonicity, mechanical effects, pathological processes in organism *etc.*) erythrocytes lose their native shape [3]. Erythrocyte membrane is a link, perceiving and responding to an external factors and erythrocyte shape is the indicator of membrane changes. Preservation of erythrocyte morphological integrity after cryopreservation can testify to a sufficient level of metabolic processes, integrity, normal cell functioning. Mammalian erythrocytes have structural and morphological peculiarities. Therefore studying a specific character of erythrocyte responses to low temperature effect is an actual cryobiological task.

The research was aimed to investigate the peculiarities of transformation of equine, bovine and canine erythrocytes after freeze-thawing under non penetrative (polyethylene oxide with molecular mass of 1500 – PEO-1500) and penetrative (dimethyl sulfoxide – DMSO) cryoprotectants.

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Kharkov State Zooveterinary Academy, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

после замораживания-отогрева под защитой непроницающего (полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500 – ПЭО-1500) и проникающего (диметилсульфоксид – ДМСО) криопротекторов.

Материалы и методы

Материалом исследования служили эритроциты лошади, быка и собаки. Эритроциты трехкратно отмывали изотоническим раствором NaCl, содержащим 10 мМ фосфатного буфера (центрифугирование при 1200 г в течение 5 мин).

Для низкотемпературного консервирования эритроцитов использовали криопротекторы: 30 %-й ПЭО-1500 [1] и 20 %-й ДМСО [2], которые добавляли к отмывтой суспензии клеток в соотношении 1:1 (по объему) при комнатной температуре (криоконсервант на основе ДМСО) или при 0°C на ледяной бане (ПЭО-1500). Эритроциты охлаждали до –196°C путем быстрого погружения контейнера объемом 10 мл в жидкий азот, оттаивание проводили на водяной бане (42-44°C) при постоянном покачивании контейнера. Проникающий криопротектор удаляли в три этапа [9]: к взвеси оттаянных эритроцитов добавляли равный объем гипертонического солевого раствора, содержащего 0,6 М NaCl и 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, затем эритроциты дважды промывали изотоническим раствором NaCl, pH 7,4.

Морфологические исследования проводили методом световой микроскопии на микроскопах МБИ-15У (ЛОМО, Россия) и Jena (Германия) с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Общее состояние клеток оценивали в равномерно распределенной тонким слоем капле между предметным и покровным стеклами. Для морфологической оценки особенностей формы и поверхностной структуры эритроцитов использовали общепринятую классификацию [7].

Результаты и обсуждение

Анализ экспериментальных данных показал, что эритроциты животных сразу же после забора крови имели вид дискоцитов. Содержание эхиноцитов незначительно (рис. 1). Однако полученные эритроциты в течение нескольких часов постепенно теряли традиционную двояковогнутую форму, трансформируясь в эхиноциты. Уменьшение количества дискоцитов и увеличение эхиноцитов в эритроцитарной суспензии животных, по видимому, можно объяснить трансформирующим влиянием на структуру эритроцитов компонентов консервирующего раствора “Глюгидир” (в частности цитрата), а также особенностями структуры мембран эритроцитов животных. После трехкратного отмывания и центрифугирования эритроциты

Materials and methods

Equine, bovine and canine erythrocytes served as the research material. Erythrocytes were thrice washed with isotonic NaCl solution, containing 10 mM phosphate buffer (centrifugation at 1200 g for 5 min).

The following cryoprotectants were used for erythrocyte low temperature preservation: 30% PEO-1500 [1] and 20% DMSO [2], added to a washed cell suspension in 1:1 ratio (v/v) at room temperature (DMSO-based cryopreservative) or at 0°C on ice bath (PEO-1500). Erythrocytes were cooled down to –196°C by rapid immersion of 10 ml container into liquid nitrogen, thawing was done at 42-44°C water bath at a constant container shaking. Penetrative cryoprotectant was removed in three steps [9]: an equal volume of hypertonic salt solution, containing 0.6 M NaCl and 10 mM phosphate buffer, pH 7.4 was added into the thawed erythrocyte suspension, then erythrocytes were twice washed with NaCl isotonic solution, pH 7.4.

Morphological study was performed using light microscopy method with MBI-15U (LOMO, Russia) and Jena Company (Germany) microscopes with photographic recording of morphological blood picture. General cell state was estimated in a drop, uniformly distributed by thin layer between a slide and cover glass. The standard classification was used for morphological estimation of erythrocyte shape peculiarities and surface structure [7].

Results and discussion

Analysis of experimental data demonstrated that animal erythrocytes were of discocyte shape just after blood sampling. Echinocyte content was insignificant (Fig. 1). However the procured erythrocytes lost gradually a traditional biconcave shape within several hours, by transforming into echinocytes. A decrease in discocyte amount and augmentation of echinocyte one in animal erythrocyte suspension could be apparently explained by a transforming influence of the components of “Glygicir” preservative solution (citrate, in particular) on erythrocyte structure, as well as by the peculiarities of membrane structure of animal erythrocytes. After a three-fold washing-out and centrifugation both erythrocytes of all animal species and human ones [6] gained a slightly manifested echinocyte shape. The removal of plasm proteins, in particular, albumin is known to be one of the causes of cell crenating.

During cell interaction with 20% DMSO solution the erythrocytes of all animal species gained the shape of an incomplete sphere with different depths of central well (Fig. 2). Suspending of erythrocytes in 30% PEO-1500 solution (Fig. 3) results in their flattening, that is associated with dehydration and aggregation of cells. At the same time a membrane flattening is noted.

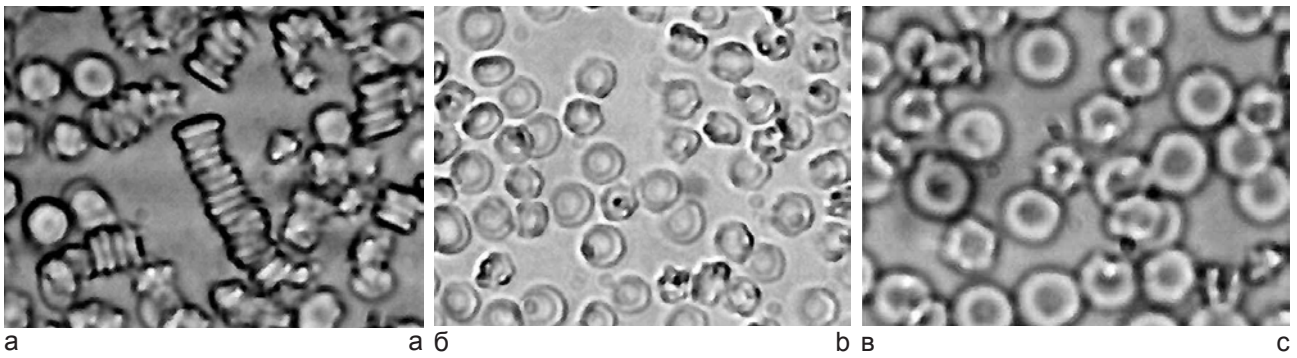


Рис. 1. Морфоэритрограммы интактных эритроцитов: лошади (а), быка (б), собаки (в). Увеличение при съемке 250.
Fig 1. Morphoerythrograms of equine (a), bovine (b), canine (c) intact erythrocytes. Magnification 250.

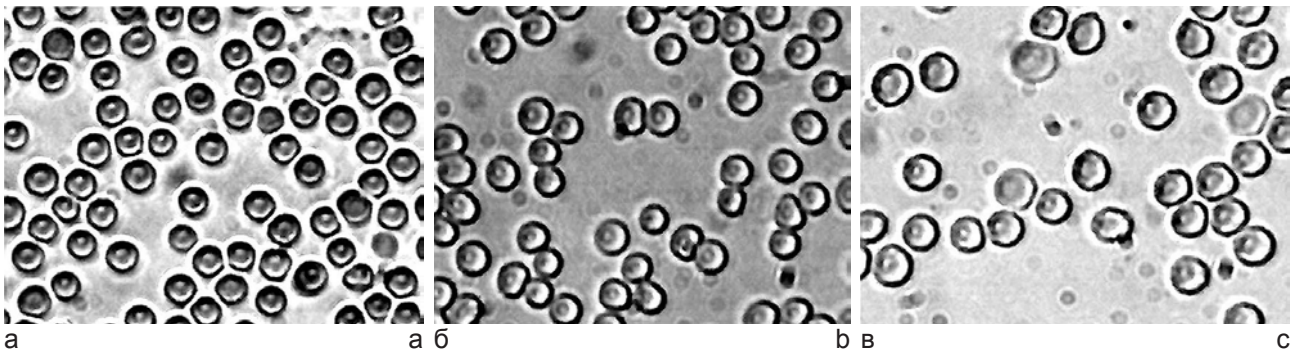


Рис. 2. Морфоэритрограммы эритроцитов лошади (а), быка (б), собаки (в) после добавления 20%-го раствора ДМСО. Увеличение при съемке 250.
Fig 2. Morphoerythrograms of equine (a), bovine (b), canine (c) erythrocytes after adding 20% DMSO solution. Magnification 250.

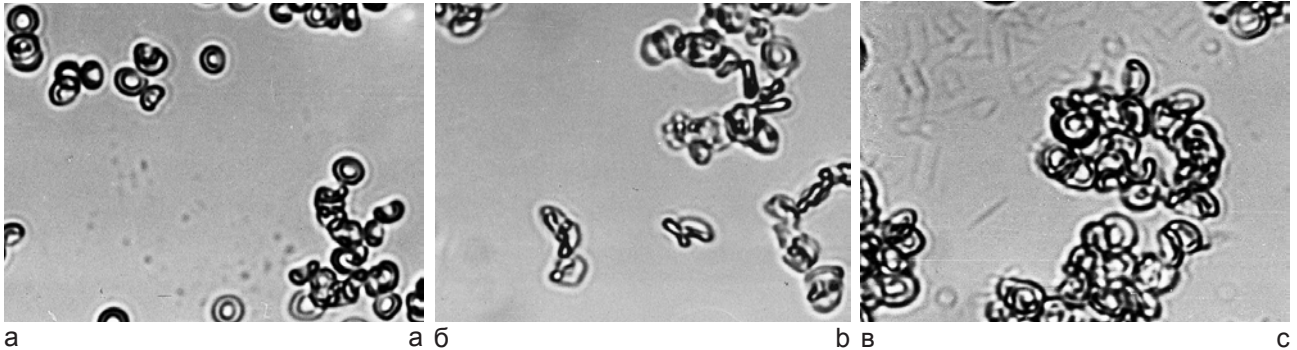


Рис. 3. Морфоэритрограммы эритроцитов лошади (а), быка (б), собаки (с) после добавления 30%-го раствора ПЭО-1500 при 0°C. Увеличение при съемке 160.
Fig. 3. Morphoerythrograms of equine (a), bovine (b), canine (c) erythrocytes after adding 30% PEO-1500 at 0°C. Magnification 160.

всех видов животных, как и эритроциты человека [6] приобретали слабовыраженную эхиноцитарную форму. Известно, что одной из причин кренирования клеток является удаление белков плазмы, в частности альбумина.

При взаимодействии клеток с 20%-м раствором ДМСО эритроциты всех видов животных приобретали форму неполной сферы с разной глубиной центральной ямки (рис. 2). Суспендирование эритроцитов в 30%-м растворе ПЭО-1500 (рис. 3) приводит к их уплощению, что связано с обезво-

Analysis of frozen-thawed in the presence of 20% DMSO erythrocytes testifies to the fact that cells are mostly represented by echinocytes (Fig. 4). The majority of frozen-thawed animal erythrocytes, frozen-thawed in the presence of 30% PEO-1500 became cup-shaped (stomatocyte). Cell aggregation was more manifested under these conditions (Fig. 5).

Erythrocyte transformation into echinocytes and stomatocytes under the effect of the studied factors can be a compensatory-adaptive cell response [4]. Therefore of interest was to trace a change in the

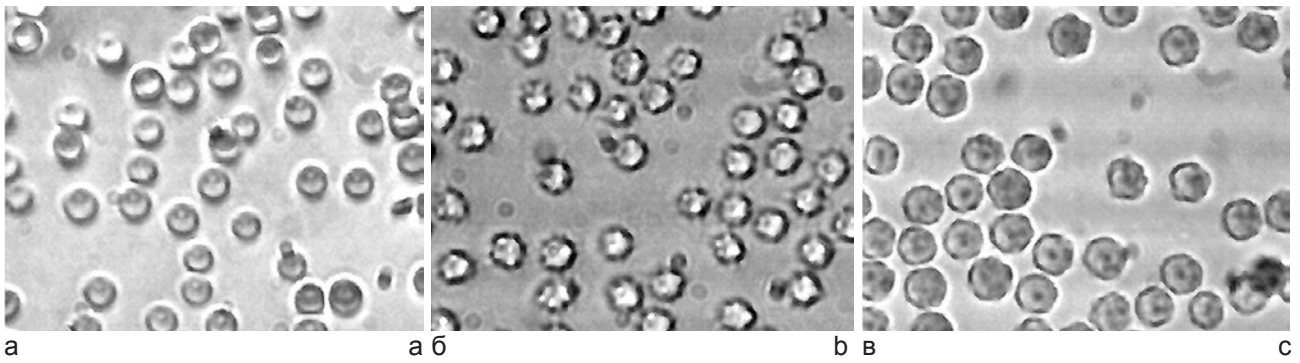


Рис. 4. Морфоэритрограммы деконсервированных эритроцитов лошади (а), быка (б), собаки (в). Криоконсервирующая среда – 20%-й раствор ДМСО. Увеличение при съемке 250.

Fig. 4. Morphoerythrograms of equine (a), bovine (b), canine (c) frozen-thawed erythrocytes. Cryopreserving medium: 20% DMSO solution. Magnification 250.

живанием и агрегацией клеток. При этом отмечается сглаженность мембран.

Анализ формы размороженных эритроцитов, криоконсервированных под защитой 20%-го ДМСО, свидетельствует о том, что в основном клетки представляют собой эхиноциты (рис.4). Большая часть размороженных эритроцитов животных, криоконсервированных под защитой 30%-го ПЭО-1500, приобретала чашевидную форму (стоматоцитоз). Агрегация клеток в этих условиях была более выражена (рис. 5).

Трансформация эритроцитов в эхиноциты и стоматоциты под воздействием исследуемых факторов может быть компенсаторно-приспособительной реакцией клеток [4]. Поэтому представляло интерес проследить за изменением формы деконсервированных эритроцитов после их возврата в физиологические условия. На рис. 6 представлены морфоэритрограммы деконсервированных эритроцитов животных после их перенесения в плазму. Установлено, что при перенесении эритроцитов лошади в плазму после криоконсервирования в криозащитной среде, содержащей 20%-й ДМСО, формируются “монетные столбики”, в которых форма эритроцитов близка по форме к дискоцитам, что может свидетельствовать о возможном сохранении основной функции эритроцитов. Формирование “монетных столбиков” отсутствует в суспензии эритроцитов быка и собаки. Этот факт, возможно, обусловлен тем, что эритроциты лошади обладают большей агрегационной способностью в плазме, чем

shape of frozen-thawed erythrocytes after their return into physiological conditions. Fig. 6 demonstrates the morphoerythrograms of frozen-thawed animal erythrocytes after their transfer into plasm. It was established that when transferring equine erythrocytes into plasm after being cryopreserved in 20% DMSO-containing cryoprotective medium, the “rouleaux” were formed, where erythrocyte shape was close to a discocyte, that could testify to a possible preservation of main erythrocyte function. The “rouleaux” formation is absent in bovine and canine erythrocyte suspension. This is possibly stipulated by the fact that equine erythrocytes have a greater aggregation ability in plasm, then those of other animal species [8]. Erythrocyte shape of bovine and canine is close to a native and is similar to that, gained by them in “Glygicir” solution within some hours. Erythrocyte transfer of all

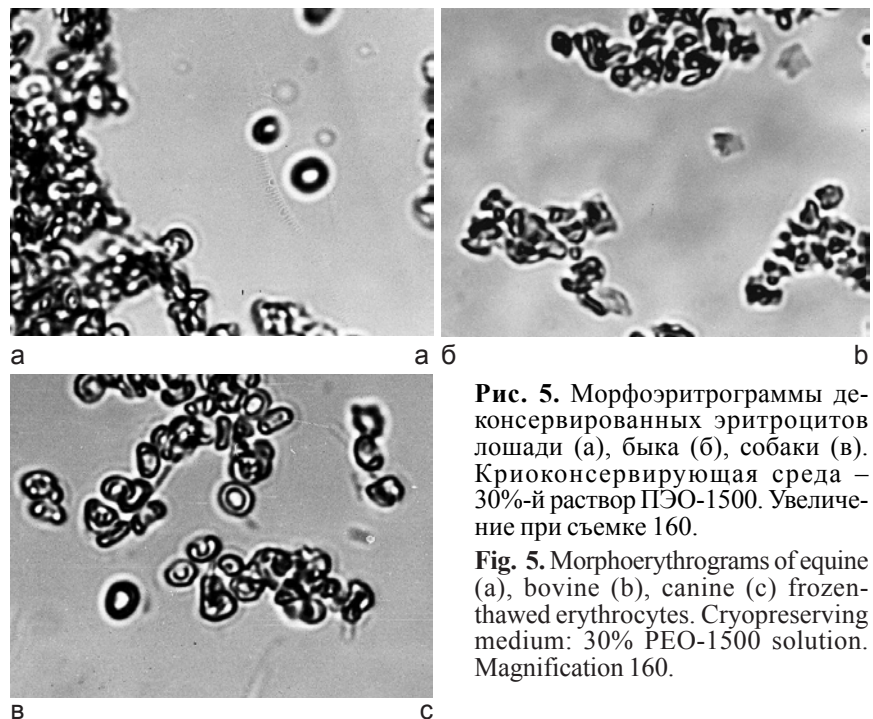


Рис. 5. Морфоэритрограммы деконсервированных эритроцитов лошади (а), быка (б), собаки (в). Криоконсервирующая среда – 30%-й раствор ПЭО-1500. Увеличение при съемке 160.

Fig. 5. Morphoerythrograms of equine (a), bovine (b), canine (c) frozen-thawed erythrocytes. Cryopreserving medium: 30% PEO-1500 solution. Magnification 160.

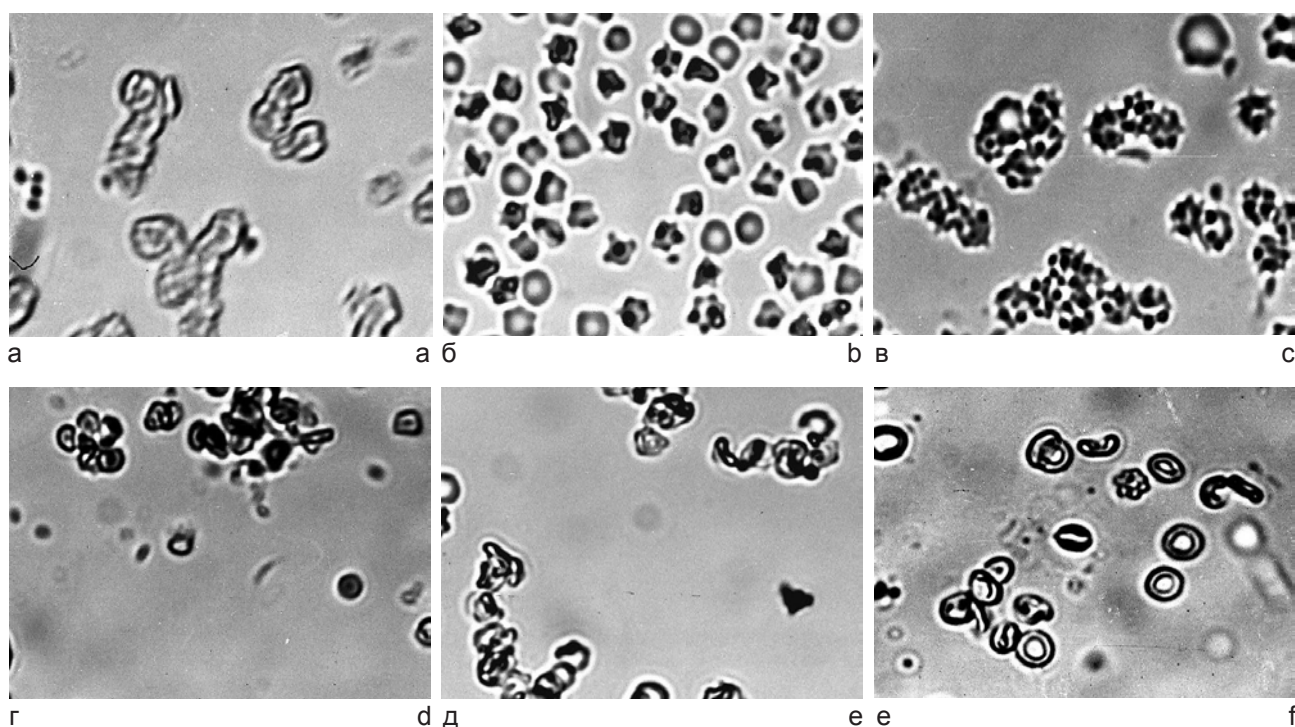


Рис. 6. Морфограммы деконсервированных эритроцитов лошади (а, г), быка (б, д), собаки (в, е) после перенесения в плазму: а, б, с – криоконсервирующая среда – 20%-й раствор ДМСО, д, е, ф – криоконсервирующая среда – 30%-й раствор ПЭО-1500. Увеличение при съемке 160.

Fig. 6. Morphograms of equine (a, d), bovine (b, e), canine (c, f) frozen-thawed erythrocytes after transferring into plasma: a, b, c – cryopreserving medium of 20% DMSO solution, d, e, f – cryopreserving medium of 30% PEO-1500 solution. Magnification 160.

эритроциты других видов животных [8]. Форма эритроцитов быка и собаки близка к нативной и подобна той, которую они приобретали в растворе “Глюгидир” в течение нескольких часов. Перенос эритроцитов всех видов животных в плазму после криоконсервирования с 30%-м ПЭО-1500 не предотвращает стоматоцитоз и агрегацию клеток.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о разном действии проникающего и непроникающего криопротекторов [5]. Деконсервированные эритроциты всех исследуемых видов животных под влиянием проникающего криопротектора трансформируются в эхиноциты, в то время как при действии непроникающего криопротектора наблюдается стоматоцитоз.

Литература

1. Бабійчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М. Новый метод криоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія.– 2000.– Т. 1, № 1. – С. 296-298.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкар Н.С. Криоконсерванты.– Киев: Наук. думка, 1979.– 198 с.
3. Козинец Г., Симоварт Ю. Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови.– Таллин: Валгус, 1984.– 190 с.

animal species into a plasma, after cryopreservation with 30% PEO-1500 does not prevent stomatocytosis and cell aggregation.

Conclusions

The results obtained testify to a different effect of penetrative and non-penetrative cryoprotectants [5]. Frozen-thawed erythrocytes of all studied animal species under the effect of penetrative cryoprotectant transform into echinocytes, meanwhile under a non-penetrative one a stomatocytosis is observed.

References

1. Babijchuk L.O., Zemlyanskikh N.G., Kuzmina L.M. New method of erythrocyte cryopreservation for clinical practice// Transplantologiya.– 2000.– Vol. 1, N1.– P. 296-298.
2. Belous A.M., Shrago M.I., Pushkar N.S. Cryopreservatives.– Kiev: Nauk. Dumka, 1979.– 198 p.
3. Kozinets G., Simovart Yu. Surface architecture of cells of peripheric blood in the norm and at blood system diseases.– Tallin: Valgus, 1984.– 190 p.
4. Kuleshova L.G. Morphological changes of human erythrocytes under cooling // Fiziol. Zhurnal.– 2005.– Vol. 52, N3.– P. 73-77.
5. Kuleshova L.G. Transformation of human erythrocytes in non-electrolytes of H-alcohol series. Part I. Morphological aspect of interaction // Problems of Cryobiology.– 1999.– N1.– P. 9-13.

4. *Кулешова Л.Г.* Морфологічні зміни еритроцитів людини за умов охолодження // *Фізіолог. журн.* – 2005. – Т. 52, №3. – С. 73-77.
5. *Кулешова Л.Г.* Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1. Морфологический аспект взаимодействия // *Пробл. криобиологии.* – 1999. – №1. – С. 9-13.
6. *Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.* Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // *Пробл. криобиологии.* – 2001. – №1. – С. 8-14.
7. *Bessis M.* Living blood cells and their ultrastructure. – Berlin, Heidelberg, New York, 1973. – 767 p.
8. *Kumaravel M., Singh M.* Sequential analysis of aggregation process of erythrocytes of human, buffalo, cow, horse, goat and rabbit // *Clin. Hemorheol.* – 1995. – №15. – P. 291-304.
9. *Sumida S., Oshikawa K.* Morphological and physiological findings of red cells cryopreserved for 30 years // *Abstracts of the 36th Annual Meeting of the Society for Cryobiology.* – Marseille, 1999. – P. 131.
6. *Kuleshova L.G., Orlova N.V., Shpakova N.M.* Antihemolytic and transforming activity of amphiphilic compounds // *Problems of Cryobiology.* – 2001. – N1. – P. 8-14.
7. *Bessis M.* Living blood cells and their ultrastructure. – Berlin, Heidelberg, New York, 1973. – 767 p.
8. *Kumaravel M., Singh M.* Sequential analysis of aggregation process of erythrocytes of human, buffalo, cow, horse, goat and rabbit // *Clin. Hemorheol.* – 1995. – №15. – P. 291-304.
9. *Sumida S., Oshikawa K.* Morphological and physiological findings of red cells cryopreserved for 30 years // *Abstracts of the 36th Annual Meeting of the Society for Cryobiology.* – Marseille, 1999. – P. 131.

Accepted in 10.10.2005

Поступила 10.10.2005