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

УДК 57. 043: 611. 018. 51: 577. 352. 462

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

ПРИЧИНА НЕДОСТАТОЧНОЙ КРИОПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (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. Эритроциты, отмытые после замораживания в среде с полиэтиленгликолем (ПЭГ-1500), имеют значительную степень повреждения (50-60%), а оставшиеся клетки морфологически представлены сфероцитами и являются осмотически хрупкими, что свидетельствует о недостаточной криопротекторной эффективности данного полимера [2]. При замораживании криозащитные компоненты подвергаются концентрированию и оказывают не только протекторное, но и повреждающее действие. Криозащитное действие полимерных непроникающих криопротекторов связано с их способностью обеспечивать сохранение репарационных свойств мембран, при этом размороженные клетки не теряют способности восстанавливать свой катионный баланс. Кроме того, защитное действие полимеров связано со структурированием воды и поддержанием ее в жидком состоянии при низких температурах в ходе замораживания (до -35°С) [4]. Однако, наряду с положительными эффектами, полимеры, концентрируясь в ходе замораживания, способствуют значительной дегидратации клеток и повреждению клеточных мембран [4]. В связи с вышеизложенным возникает задача поиска подхода для ослабления отрицательного свойства ПЭГ-1500 при замораживании. Криозащитное действие проникающих криопротекторов связано с их проникновением в клетки и с уменьшением степени их дегидратации, а также с ослаблением интенсивности гиперконцентрирования внешней среды. Вместе с тем уменьшение степени дегидратации клеток приводит к возрастанию вероятности формирования внутриклеточных кристаллов льда [4].

Приведенные данные указывает на то, что отрицательное свойство полимерного (непроникающего) криопротектора при замораживании клеточных суспензий можно ослабить при включении в криоконсервант проникающего криопротектора. Поступление последнего в клетки может привести к уменьшению степени их дегидратации и, соответственно, к ослаблению гипертонического стресса в ходе замораживания, обусловленного концентрированием непроникающего криопротектора. Уменьшение интенсивности гипертонического стресса может ослабить влияние постгипертонического стресса на клетки при размораживании и обеспечить сохранение клеточных мембран.

Транспорт сульфата в эритроциты в сульфатной среде сопряжен с транспортом ионов H^+ [9]. Можно предположить, что при повреждении мембран анионы SO_4^{2} и соответственно ионы H^+ будут проникать в эритроциты дополнительным неспецифическим путем. При этом вычисляемые скорости транспорта ионов могут превышать таковые показатели для интактных клеток. Поэтому результаты исследования транспорта ионов H^+ и анионов SO_4^{2-} могут использоваться для оценки барьерной функции мембран эритроцитов при замораживании. При охлаждении эритроцитов в мембранах могут появляться повреждения, которые при отмывании криоконсерванта способствуют образованию гемолитических пор, проницаемых для гемоглобина. При этом эритроциты гемолизируют. Однако в оставшихся клетках указанные повреждения могут образовывать поры меньшего размера, непроницаемые для гемоглобина (м. м. 64500), но проницаемые для молекул меньших размеров, таких как глутатион (м. м. 307). Такие клетки утрачивают барьерную функцию мембран для глутатиона.

Цель работы – исследовать барьерную функцию мембран эритроцитов для сульфата и глутатиона, после замораживания в комбинированной среде, содержащей ПЭГ-1500 и 1,2-пропандиол (1,2-ПД).

Объект и методы исследования. В работе использовали NaCl (х. ч.), NH_4Cl (х. ч), Na_2SO_4 (х. ч.), сахарозу (ч. д. а.), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500, Merck), 1,2-пропандиол (1,2-ПД, Германия). Среды замораживания содержали NaCl, NH_4Cl, сахарозу, ПЭГ-1500 и 1,2-ПД.

Эритроциты человека получали из крови 2-й группы от доноров мужского пола после четырехкратного отмывания их изотоническим раствором NaCl. Металлические контейнеры объемом 1 мл с образцами эритроцитов в средах замораживания с гематокритом 0,8 или 40% инкубировали 30 мин при 25°С, затем погружали в жидкий азот (–196єС) на 30 мин (скорость охлаждения 200-300°С/мин). Замороженные образцы эритроцитов размораживали на водяной бане при 40°С в течении 3 мин (начальная скорость отогрева 900-1200°С/мин). Затем к 1 мл размороженной клеточной суспензии,

Таблица 1

Показатели барьерных свойств мембран эритроцитов, отмытых после замораживания-отогрева (с гематокритом 40%) в сахарозо-солевой среде (0,05 моль/л NaCl+0,2 моль/л сахарозы) с ПЭГ-1500 и 1,2-ПД

Среды замораживания	Гемолиз, %	Глутатион, мкмоль/г Hb		Поток ионов H^+ в сульфатной среде, мольЧсм$^{-2}$Чс$^{-1}$	
		До отмывания криоконсервата	После отмывания криоконсерванта	J_{out}Ч10^{14}	J_{in}Ч10^{14}
ПЭГ-1500 (15%)	55±3,0	9,7±1,6	4,8±0,7*	2,08±0,29#	1,45±0,20#
ПЭГ-1500 (15%) +1,2-ПД (5%)	36±2,5	9,5±1,8	7,3±1,5	1,40±0,20	1,10±0,17
Интактные клетки		9,3±1,4		1,18±0,13	0,87±0,10

Примечание: * – статистически достоверно по сравнению с образцами до отмывания криоконсерванта ($p<0,05$); # – статистически достоверно по сравнению с интактными клетками ($p<0,05$).

при перемешивании, медленно добавляли 9 мл теплого (37°С) изотонического раствора NaCl в течение не менее 30 секунд (скорость добавления не более 0,3 мл/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.

Степень гемолиза эритроцитов после спектрофотометрического определения количества гемоглобина, измеряя поглощение в супернатанте образцов при длине волны 543 нм, вычисляли по формуле:

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].

Транспорт ионов H^+ в эритроцитах в сульфатной среде (0,11 ммоль/л Na_2SO_4) исследовали в термостатируемой ячейке (37°С) с pH электродом при постоянном перемешивании клеточной суспензии [3].

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 $p< 0,05$ [1].

Результаты исследований и их обсуждение. Установлено, что замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к их значительному гемолизу, потере глутатиона при отмывании размороженных клеток и к повышению скорости потока ионов H^+ (соответственно, анионов SO_4^{2-}) в сульфатной среде в оставшихся клетках, отмытых 0,9%-м раствором NaCl после размораживания **(табл. 1)**. Включение в среду дополнительно 1,2-ПД приводит к снижению степени повреждения эритроцитов. При этом концентрация глутатиона и скорость потока ионов H^+ в оставшихся эритроцитах незначительно отличается от таковых величин для интактных клеток **(табл. 1)**. В последнем случае результаты указывают на сохранение барьерной функции мембран эритроцитов для сульфата и глутатиона.

Возникает вопрос о механизме, который способствует сохранению барьерной функции мембран эритроцитов при замораживании в комбинированной среде с непроникающими и проникающим криопротекторами.

Были проведены эксперименты с использованием сахарозо-солевой среды при замене катиона Na^+ на проникающий в клетки катион NH_4^+. С этой целью эритроциты замораживали с низким гематокритом (0,8%) в сахарозо-солевых средах. Результаты, представленные на **рис. 1** показывают, что в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl повышение концентрации сахарозы до 0,4 моль/л приводит к снижению степени повреждения эритроцитов. Повышение концентрации сахарозы выше 0,4 моль/л вызывает рост гемолиза эритроцитов **(рис. 1, кривая 1)**. Вероятно, при концентрации сахарозы выше 0,4 моль/л проявляется вклад данного неэлектролита в гипертонический стресс на клетки при замораживании, который оказывает повреждающее воздействие.

Замена Na^+ на проникающий катион NH_4^+ приводит к изменению кривой зависимости степени повреждения эритроцитов от концентрации сахарозы **(рис. 1, кривая 2)**. При этом существенное снижение гемолиза отмечается в средах, содержащих 0,5-0,6 моль/л сахарозы, что вероятно связано с ослаблением гипертонического стресса на клетки при замораживании и проявлением защитной эффективности сахарозы.

Для следующего эксперимента использовали гипертоническую среду, содержащую 0,15 моль/л NaCl и 0,4 моль/л сахарозы, состав которой оказался «переходным» для устойчивости эритроцитов при замораживании-отогреве **(рис. 1, кривая**

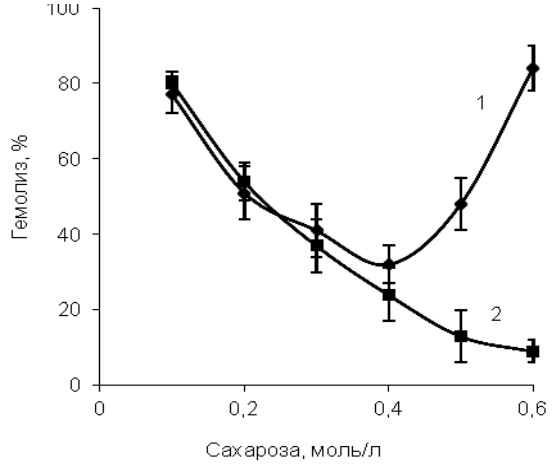


Рис. 1. Гемолиз эритроцитов в цикле быстрого замораживания-отогрева в сахарозо-солевых средах (гематокрит 0,8%): 1 – 0,15 моль/л NaCl; 2 – 0,15 моль/л NH_4Cl.

1). Присутствие в данной сахарозо-солевой среде ПЭГ-1500 (5%) вызывает повышение степени повреждения эритроцитов при замораживании **(рис. 2, столбики 1)**. При использовании среды, содержащей 0,15 моль/л NH_4Cl и 0,4 моль/л сахарозы, ПЭГ-1500 проявляет защитный эффект и отмечается снижение степени повреждения клеток **(рис. 2, столбики 2)**.

Полученные результаты указывают на то, что криопротекторная эффективность ПЭГ-1500 зависит от вида катиона электролита. При использовании непроникающего катиона (Na+) интенсивность действия гипертонического стресса на клетки при концентрировании сахарозо-солевой среды значительна, а концентрирование полимера дополнительно усиливает стресс. При использовании

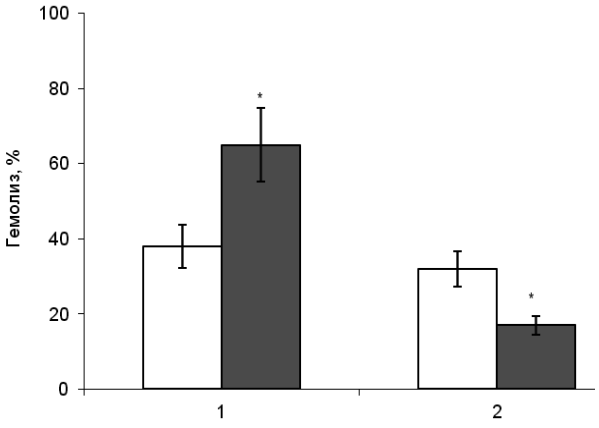


Рис. 2. Гемолиз эритроцитов в цикле быстрого замораживания-отогрева в сахарозо-солевых средах (гематокрит 0,8%). 1 – среды содержат 0,4 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NaCl; 2 – среды содержат 0,4 моль/л сахарозы + 0,15 моль/л NH_4Cl. □ – без криопротектора, ■ – ПЭГ-1500 (5%). *– статистически достоверно по сравнению с показателями гемолиза эритроцитов при замораживании в среде без криопротектора ($p<0,05$).

проникающего катиона (NH_4+) интенсивность действия гипертонического стресса, определяемая одной сахарозой, менее выражена, поэтому криозащитный эффект полимера доминирует над его криоповреждающим действием. Вероятно, баланс протектирующего и повреждающего действия ПЭГ-1500 зависит от интенсивности нарастания гипертонического градиента на мембранах клеток при замораживании.

Согласно данным литературы при замораживании эритроцитов с низкой скоростью (0,3°С/мин) в среде, содержащей 0,1 моль/л NH_4Cl+0,3 моль/л сахарозы, отмечалось повреждающее действие сахарозы вследствие значительной дегидратации клеток [7]. В наших экспериментах при быстрой скорости замораживания (см. раздел методы) в среде с NH_4Cl повышение концентрации сахарозы до 0,6 моль/л приводит к криозащитному эффекту **(рис. 1, кривая 2)**. Полученные результаты и данные литературы согласуются с тем, что защитные свойства сахарозы и полимерных непроникающих криопротекторов проявляются при быстрых скоростях замораживания, когда уменьшается время действия гипертонического стресса и вероятность повреждения клеток данным повреждающим фактором [4].

Полученные результаты указывают на то, что при быстрой скорости замораживания, концентрирование ПЭГ-1500 может вносить вклад в гипертонический стресс и приводить к повреждению клеток. Повреждающее действие данного фактора можно ослабить при комбинировании в среде замораживания ПЭГ-1500 с 1,2-ПД.

Клетки, которые подвергались меньшему воздействию гипертонического стресса при охлаждении, могут выдерживать постгипертонический стресс при размораживании. Для выяснения этого исследовали так называемый эффект «упаковки» (эффект «упаковки» – проявление большей степени повреждения эритроцитов при замораживании-отогреве с высоким гематокритом по сравнению с низким гематокритом) [8]. В условиях быстрого замораживания и быстрого отогрева данный эффект определяется постгипертоническим стрессом на стадии отогрева [6].

При замораживании-отогреве эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 гемолиз был выше в образцах с высоким (40%) гематокритом по сравнению с низким (0,8%) гематокритом **(рис. 3, столбики 1)**, т. е., отмечалось проявление эффекта «упаковки». Включение в среду замораживания 1,2-ПД приводит к устранению данного эффекта **(рис. 3, столбики 2)**. Следовательно, для сохранения устойчивости эритроцитов к действию постгипертонического стресса при отогреве необходимо сочетание в среде замораживания непроникающего (ПЭГ-1500) и проникающего (1,2-ПД) криопротекторов.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что ПЭГ-1500 может проявлять криозащитное и криоповреждающее действие на эритроциты, баланс которых зависит от интенсивности концентрирования внешнего раствора при

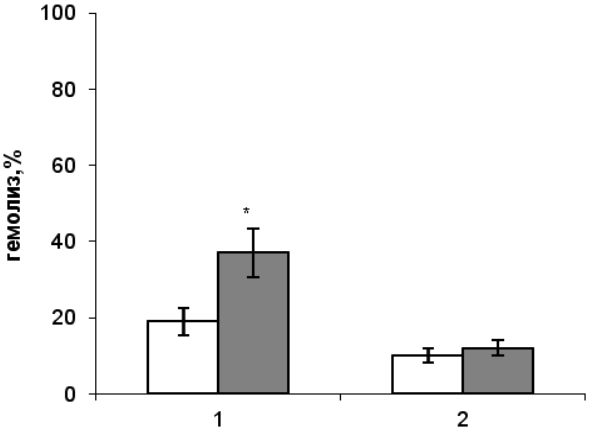


Рис. 3. Гемолиз эритроцитов в цикле быстрого замораживания-отогрева в сахарозо-солевой среде (0,05моль/л NaCl + 0,2 моль/л сахарозы), содержащей ПЭГ-1500 (5%), с различным гематокритом (□ – 0,8%, ■ – 40%.). 2 – среда дополнительно включает 1,2-ПД (5%). *– статистически достоверно по сравнению с соответствующими показателями гемолиза при замораживании с гематокритом 0,8% (p<0,05).

замораживании. Включение в среду замораживания 1,2-ПД и проникновение его в клетки обеспечивает повышение устойчивости мембран к гипертоническому и постгипертоническому стрессу в цикле замораживания-отогрева и сохранению барьерной функции мембран эритроцитов после отмывания криоконсерванта.

Выводы.

1. В эритроцитах, отмытых после замораживания в среде с ПЭГ-1500, нарушается барьерная функция мембран для сульфата и глутатиона. Дополнительное включение в среду 1,2-ПД приводит к сохранению барьерной функции мембран.

2 Включение ПЭГ-1500 в концентрации 5% в сахарозо-солевую среду (0,4 моль/л сахарозы+0,15 моль/л NaCl) приводит к повышению степени повреждения эритроцитов при замораживании-отогреве. При этом замена в среде непроникающего катиона (Na^+) на проникающий (NH_4^+) выявляет протектирующий эффект ПЭГ-1500.

3. В цикле замораживания-отогрева эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 отмечается большая степень их повреждения в образцах с высоким (40%) гематокритом по сравнению с низким (0,8%) гематокритом. Различие устраняется при включении в среду 1,2-ПД.

Перспективы дальнейших исследований. В следующей работе планируется исследовать причину недостатка криозащитного эффекта декстрана при замораживании эритроцитов.

Литература

1. 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.
2. Рамазанов В. В. Свойства эритроцитов, замороженных в комбинирован-ной среде с полиэтиленгликолем и диметилсульфоксидом / В. В. Рамазанов, Т. И. Дейнеко, Е. Л. Воловельская, В. А. Коптелов, В. А. Бондаренко // Биотехнология. – 2012. – Т. 5, №2. – С. 106–114.
3. Рамазанов В. В. Функционирование системы транспорта ионов H^+ при модификации мембран эритроцитов в условиях, моделирующих условия замораживания / В. В. Рамазанов, Р. Ф. Забродский, Я. Ю. Найдюк, В. А. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип. 3 – С. 186-192.
4. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and resent advancement on 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. – New York: Grune&Stratton, 1975. – 160 p.
6. Levin R. L. The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing / R. L. Levin // Cryobiology. – 1982. – Vol. 19, № 6. – P. 669.
7. 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.
8. Pegg D. E. The effect of cell concentration on the recovery of human erythrocytes after freezing and thawing in the presence of glycerol / D. E. Pegg // Cryobiology. – 1981. – Vol. 18, № 3. – P. 221–228.
9. Romano L. Characterization of anion transport system in trout red blood cell / L. Romano, H. Passow // Am. J. Physiol. – 1984. – Vol. 246. – P. 330–338.

УДК 57. 043: 611. 018. 51: 577. 352. 462

ПРИЧИНА НЕДОСТАТНЬОЇ КРІОПРОТЕКТОРНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЮ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ ЕРИТРОЦИТІВ

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

Резюме. Досліджували бар’єрні властивості мембран еритроцитів, які заморожували у рідкому азоті (–196°С) у середовищі, що містить цукрозу, ПЕГ-1500 та 1,2-ПД. При заморожуванні-відігріві у середовищі, яке містить цукрозу+ПЕГ-1500, відзначається прояв постгіпертонічного стресу і порушення бар’єрної функції мембран що до сульфату та глутатіону у залишковій частині клітин після відмивання кріоконсерванту. Включення у вказане середовище 1,2-ПД призводить до послаблення постгіпертонічного стресу, зниження ступеня пошкодження еритроцитів при заморожуванні і збереження бар’єрних властивостей мембран у залишковій частині клітин. Отримані результати дозволяють припустити, що ПЕГ-1500 виявляє кріозахисну та кріопошкоджуючу дії що до еритроцитів, баланс яких залежить від інтенсивності гіперконцентрування

кріоконсерванту і ступеня дегідратації клітин при заморожуванні. Включення у середовище заморожування 1,2-ПД та проникнення його у клітини запобігає «критичний» ступінь дегідратації клітин і підвищує стійкість мембран що до гіпертонічного та постгіпертонічного стресу у циклі заморожування-відігріву, що забезпечує збереження бар'єрної функції мембран еритроцитів після відмивання кріоконсерванту.

Ключові слова: еритроцити, заморожування, бар'єрні властивості мембран.

УДК 57. 043: 611. 018. 51: 577. 352. 462

ПРИЧИНА НЕДОСТАТОЧНОЙ КРИОПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ЭРИТРОЦИТОВ

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

Резюме. Исследовали барьерные свойства мембран эритроцитов, замороженных в жидком азоте (–196°С) в среде, содержащей сахарозу, ПЭГ-1500 и 1,2-ПД. При замораживании-отогреве в среде, содержащей сахарозу+ПЭГ-1500, отмечается проявление постгипертонического стресса и нарушение барьерной функции мембран для сульфата и глутатиона в оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта. Включение в указанную среду 1,2-ПД приводит к ослаблению постгипертонического стресса, снижению степени повреждения эритроцитов при замораживании и сохранению барьерных свойств мембран в оставшейся части клеток. Полученные результаты позволяют предположить, что ПЭГ-1500 может проявлять криозащитное и криоповреждающее действие на эритроциты, баланс которых зависит от интенсивности гиперконцентрирования криоконсерванта и степени дегидратации клеток при замораживании. Включение в среду замораживания 1,2-ПД и проникновение его в клетки предотвращает «критическую» степень дегидратации клеток и повышает устойчивость мембран к гипертоническому и постгипертоническому стрессу в цикле замораживания-отогрева, что обеспечивает сохранение барьерной функции мембран эритроцитов после отмывания криоконсерванта.

Ключевые слова: эритроциты, замораживание, барьерные свойства мембран.

UDC 57. 043:611. 018. 51:577. 352. 462

Cause of Insufficient Cryoprotective Effectiveness of Polyethylene Glycol During Freezing of Erythrocytes

Ramazanov V. V., Volovelskaya E. L., Koptelov V. A., Bondarenko V. A.

Summary. During freezing of cell suspensions the components of cryopreservative are exposed to concentrating and have both protective and damaging effect on cells. Cryoprotective effect of polymeric non-penetrating cryoprotectants is associated with their capability to structure water and maintains it in liquid state at low temperatures during freezing (down to –35°C), providing preservation of reparative properties of membranes. Herewith frozen-thawed cells do not lose the capacity to recover its cation balance. Along with the positive effects polymers concentrating during freezing contribute to a significant dehydration of cells and damage of cell membranes. Therefore the problem of approach search of weakening a negative property of polymers during freezing arises. Cryoprotective effect of penetrating cryoprotectants is associated with their penetration into cells and reduction of their dehydration rate, weakening of intensity of environmental hyperconcentrating as well. Moreover reduction of cell dehydration rate may result in probability increase of formation of intracellular ice crystals. Probably negative property of polymeric (non-penetrating) cryoprotectant during freezing of cell suspensions is possible to weaken during introduction of penetrating cryoprotectant into cryopreservative. Inflow of the last into cells may result in reduction of their dehydration rate and, accordingly, weakening of hypertonic stress during freezing, stipulated by concentrating of non-penetrating cryoprotectant. The decrease in intensity of hypertonic stress may weaken the effect of post-hypertonic stress on cells during freeze-thawing and provide preservation of structural and functional properties of cell membranes. Recently there has been used a combined cryopreservative, containing hydroxyethylated starch and dimethyl sulfoxide being effective during freezing of different cells. In addition the mechanisms of protective efficiency of cryopreservatives, including non-penetrating and penetrating cryoprotectants are not revealed.

We have studied the barrier properties of erythrocyte membranes frozen in liquid nitrogen (-196°C) in the medium containing sucrose, PEG-1500 and 1,2-PD. During freeze-thawing in the medium with sucrose+PEG-1500 we noted the disorder of membrane barrier function for sulfate and glutathione in the rest part of cells after washing out of cryopreservative. The supplementation of this medium with 1,2-PD induces the weakening of post-hypertonic stress, decrease of erythrocyte damage level during freezing and preservation of membrane barrier properties in the rest part of cells. The obtained results allows suggesting that PEG-1500 can have cryoprotective and cryodamaging effect on erythrocytes, balance of which depends on the intensity of preservative hyperconcentrating and cell dehydration degree during freezing. The supplementation of the medium with 1,2-PD and its penetration into cells prevents «critical» degree of cell dehydration and rises the resistance of membranes to hypertonic and post-hypertonic stress in freeze-thawing cycle providing the preservation of barrier function of erythrocyte membranes after washing out of cryopreservative.

Key words: erythrocytes, freezing, membrane barrier functions.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.

Стаття надійшла 22. 05. 2013 р.