© П. М. Зубов

УДК 612. 649. 011. 87:615. 014. 41:612. 111:547. 422

П. М. Зубов

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОЙ АСИММЕТРИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КОРДОВОЙ И ДОНОРСКОЙ КРОВИ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ с ПЭО-1500

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ (г. Харьков)

Работа выполнялась в соответствии с научной темой «Изучение механизмов структурно-функциональных изменений ядросодержащих клеток кордовой крови и эритроцитов под влиянием экзо- и эндоцеллюлярных криопротекторов и низких температур», государственный регистрационный номер 0109U00278.

Вступление. Кордовая кровь (КК) и полученные из нее препараты, находят в последнее время все большее применение в клинической практике. Причем в лечебных целях используется как цельная кордовая кровь, так и отдельные ее компоненты [1]. Эритроциты КК имеют целый ряд структурных особенностей, которые позволяют использовать их в клинической практике. Это связано с высоким содержанием в них фетального гемоглобина, характеризующегося повышенным сродством к кислороду [6, 7]. Это свойство эритроцитов КК может быть использовано в практике неонатологии, а также для трансфузии пациентам с различными легочными патологиями, гипоксическими состояниями, способствуя нормализации газообмена в тканях.

Использование эритроцитов КК возможно лишь при наличии запасов данной фракции. Решение этой задачи осуществимо только при долгосрочном хранении клеток в замороженном состоянии. Наиболее перспективными являются технологии, исключающие отмывание клеток от криопротектора. Поэтому разработка методов криоконсервирования эритроцитов КК, позволяющих использовать их сразу после размораживания, является актуальной проблемой во всем мире. Создание безотмывочных технологий базируется на использовании экзоцеллюлярных криопротекторов, одним из которых может выступать полиэтиленоксид с м. м. 1500 (ПЭО-1500). Криоконсервирование эритроцитов донорской крови под защитой ПЭО-1500 позволяет сохранить их целостность после размораживания на высоком уровне [3]. Сохранность клеток, как было показано авторами, обеспечивается путем модификации их мембрано-цитоскелетного комплекса, под влиянием криопротектора при условии соблюдения определенных условий для избежания осмотического и температурного шока клеток [2].

Взаимодействия в мембрано-цитоскелетном комплексе играют важную роль в стабилизации асимметричного распределения фосфатидилсерина в мембранном бислое [8]. Поэтому логично предположить, что нарушение взаимодействия между цитоскелетом и мембранным бислоем, вызванное изменением цитоскелетных белков, будет влиять на распределение фосфолипидов.

Поскольку плазматическая мембрана и цитоскелетная белковая сеть эритроцитов кордовой крови имеет свои специфические особенности, отличающие их от эритроцитов донорской крови, можно предположить, что их устойчивость к изменениям физико-химических факторов среды в процессе замораживания-отогрева и после перенесения их в кровеносное русло будет отличаться.

Целью работы было выявление изменений липидной асимметрии в мембранах эритроцитов донорской и кордовой крови под влиянием непроникающего криопротектора ПЭО-1500 при охлаждении и замораживании-отогреве.

Объект и методы исследования. Исследования проводили на эритроцитах кордовой и донорской крови человека, заготовленных на консерванте «Глюгицир».

Обработку эритроцитов криопротектором ПЭО-1500 проводили дозированно в соотношении 1:1 по объему до конечной концентрации 15% при температуре 0-4^{0}С. Криопротектор ПЭО-1500, был приготовлен на физиологическом растворе (рН 7,4). Замораживали до температуры -196^{0}С путем погружения контейнера в жидкий азот. Оттаивали на водяной бане при температуре 40-42^{0}С. После размораживания клетки переносили в физиологический раствор 1:10 по объему с поддержанием температуры 37^{0}С на протяжении 1 часа (модель трансфузии).

Уровень гемолиза эритроцитов определяли по содержанию свободного гемоглобина в супернатанте спектрофотометрическим методом на СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 543 нм.

Определение фосфатидилсерина осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием набора Annexin V-FITC detection KIT I. Для минимизации ошибки в пробе собирали 500000 событий. Результаты оценивали с помощью программы для ПК – CELLQuest Pro. Полученные результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты исследований и их обсуждение. Асимметричное распределение фосфолипидов является основой для нормального функционирования

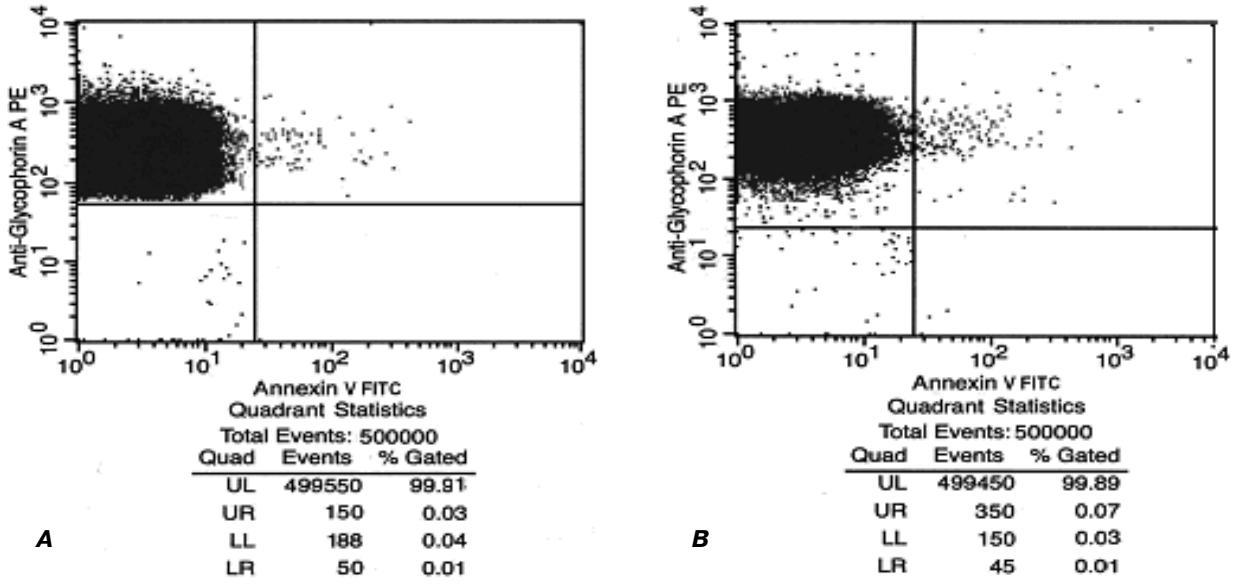


Рис. Цитограмма процента аннексинV⁺- клеток нативных эритроцитов (А) донорской и (Б) кордовой крови.

мембраны и клетки в целом. Перестройки в липидной организации мембраны, которые происходят под влиянием криопротектора ПЭО-1500, а также изменения опосредованные через модификации белок-белковых и белок-липидных взаимодействий в процессе криоконсервирования могут приводить к нарушению асимметричного распределения фосфолипидов в мембране [4].

В связи с этим для определения изменений липидной асимметрии мембраны, под влиянием криопротекторов и других факторов криоконсервирования, нами был применен метод проточной цитофлуориметрии с использованием маркера аннексин V. АннексинV – белок с высоким сродством к фосфатидилсерину. Он связывается с клетками, у которых он расположен на внешней стороне мембраны. В норме фосфатидилсерин локализован только на внутренней стороне. Поэтому, по связыванию аннексина с фосфатидилсерином можно судить о степени нарушения распределения липидов в бислое [5].

Изучение влияния факторов криоконсервирования на изменение распределения фосфатидилсерина в мембране эритроцитов донорской и кордовой крови показали, что как группы контрольных эритроцитов, так и обработанных криопротектором характеризовались очень низким процентом аннексинV⁺- клеток (**рис.**).

После замораживания-отогрева у эритроцитов выявлялось значительное увеличение процента аннексин V⁺-клеток: в донорской крови до 17,1±3,5%, в кордовой крови процент аннексинV⁺ клеток составил 11,5±2,9% (**табл.**).

В следующей серии экспериментов мы провели изучение липидной асимметрии у деконсервированных эритроцитов при моделировании процесса трансфузии перенесением их в физиологические условия, поскольку данные условия способствуют выявлению дефектов, образовавшихся после замораживания-отогрева в клетках.

Определение аннексинV⁺- клеток после перенесения их в физиологические условия (так называемая «модель трансфузии») показало, что процент эритроцитов как у донорской, так и у кордовой крови, с экспонированным на внешней стороне мембраны фосфатидилсерином практически не

Таблица

Процент аннексин V⁺- клеток и гемолиз эритроцитов кордовой и донорской крови до и после криоконсервирования

Группы \ Условия эксперимента		До криоконсервирования		После размораживания	
		Контроль	Обработка ПЭО-1500	Обработка ПЭО-1500	После «трансфузии»
Эритроциты кордовой крови	Процент аннексин V⁺-клеток	0,08±0,02	0,13±0,03	11,5±2,9*	0,15±0,05
	Процент гемолиза	0	0	1,7±0,1*	12,3±3,9*
Эритроциты донорской крови	Процент аннексин V⁺-клеток	0,03±0,005	0,07±0,02*	17,1±3,5*	0,065±0,025
	Процент гемолиза	0	0	2,3±0,32*	15,0±4,5*

Примечание: Данные представлены в виде M±SE. *- данные отличаются от контроля с уровнем p<0,05.

отличается от соответствующих групп до криоконсервирования, что связано с гемолизом части клеток. Однако, перенесение деконсервированных донорских эритроцитов в физиологические условия вызывало гемолиз 15,0±4,5% клеток, в суспензии же кордовых эритроцитов гемолиз был на уровне 12,3±3,9%. Полученные результаты позволили продемонстрировать четкую корреляцию между процентом аннексин меченых клеток сразу после размораживания и уровнем гемолиза эритроцитов после перенесения клеток в физиологические условия (Табл. 1). Полученные данные свидетельствуют, что нарушение липидной асимметрии на этапе замораживания-отогрева приводит к гемолизу после переноса в изотонию именно этой части поврежденных клеток.

Выводы.

1. Показана высокая криозащитная эффективность непроникающего криопротектора ПЭО-1500 при криоконсервировании эритроцитов кордовой крови.

2. Выявлена большая устойчивость эритроцитов кордовой крови к факторам низкотемпературного корсервирования по сравнению с эритроцитами донорской крови.

3. Обнаружена корреляция между процентом аннексин V^+-клеток сразу после размораживания и уровнем гемолиза эритроцитов после перенесения их в физиологические условия.

Перспективы дальнейших исследований. Исходя из обнаруженной лучшей сохранности эритроцитов кордовой крови в процессе криоконсервирования, можно предположить, что структура мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов кордовой крови под влиянием непроникающего криопротектора ПЭО-1500 модифицируется иначе, чем у эритроцитов донорской крови. Дальнейшие исследования этих модификаций позволят расширить представления как о механизмах действия непроникающих криопротекторов, так и о механизмах криоповреждения и криозащиты биологических объектов.

Литература

1. Абдулкадыров К. М. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала / К. М. Абдулкадыров, Н. А. Романенко // Трансфузиология. – 2003. – Т. 4, №1. – С. 15–33.
2. Бабийчук Л. А. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 / Л. А. Бабийчук, Н. Г. Землянских // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 35–41.
3. Пат. України № 30888А Спосіб кріоконсервування еритроцитів / Бабійчук Л. О., Грищенко В. І., Сумида С. та ін. Заявл. 16. 06. 98. Опубл. 15. 12. 2000. Бюл. № 7, С. 1. 20.
4. Boas F. E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia / F. E. Boas, L. Forman, E. Beutler // PNAS. – 2001. – Vol. 95. – P. 3077–3081.
5. Kuypers F. A. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V / F. A. Kuypers, R. A. Lewis, M. Hua // Blood. – 1996. – Vol. 87, № 3. – P. 1179–1187.
6. Palis J. Developmental biology of erythropoiesis / J. Palis, G. B. Segel // J. Blood Rev. – 1998. – Vol. 12, № 2. – P. 106–114.
7. Pranke P. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood / P. Pranke, R. Failace, W. Allebrandt // Acta Haematol. – 2001. – Vol. 105, №. 4. – P. 251–256.
8. Xiu-Li An., Structural and functional characterization of protein 4. 1R- phosphatidylserine interaction / An Xiu-Li., Y. Takakuwa, S. Manno, N. Mohandas // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 35778–35785.

УДК 612. 649. 011. 87:615. 014. 41:612. 111:547. 422

ЗМІНА ЛІПІДНОЇ АСИМЕТРІЇ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ КОРДОВОЇ І ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ З ПЕО-1500

Зубов П. М.

Резюме. Метою роботи було вивчення змін ліпідної асиметрії в мембранах еритроцитів донорської і кордової крові під впливом непроникаючого кріопротектора ПЕО-1500 при охолодженні й заморожуванні-відігріванні. Показано високу ефективність використання безвідмивної технології з використанням непроникаючого кріопротектора ПЕО-1500 при кріоконсервуванні еритроцитів кордової крові. Виявлено більшу стійкість мембрано-цитоскелетного комплексу еритроцитів кордової крові до факторів низькотемпературного консервування у порівнянні з еритроцитами донорської крові.

Ключові слова: кордова кров, еритроцити, кріопротектор ПЕО-1500, кріоконсервування.

УДК 612. 649. 011. 87:615. 014. 41:612. 111:547. 422

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОЙ АСИММЕТРИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КОРДОВОЙ И ДОНОРСКОЙ КРОВИ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ С ПЭО-1500

Зубов П. М.

Резюме. Целью работы было изучение изменений липидной асимметрии в мембранах эритроцитов донорской и кордовой крови под влиянием непроникающего криопротектора ПЭО-1500 при охлаждении и замораживании-отогреве. Показана высокая эффективность использования безотмывочной технологии с использованием непроникающего криопротектора ПЭО-1500 при криоконсервировании эритроцитов кордовой крови. Выявлена большая устойчивость мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов кордовой крови к факторам низкотемпературного консервирования по сравнению с эритроцитами донорской крови.

Ключевые слова: кордовая кровь, эритроциты, криопротектор ПЭО-1500, криоконсервирование.

UDC 612. 649. 011. 87:615. 014. 41:612. 111:547. 422

Altered Lipid Asymmetry of Membranes of Red Blood Cells of Cord and Donor Blood under Cryoconservation with PEG-1500

Zubov P. M.

Summary. Cord blood (CB) and preparations, obtained from it are widely used in clinical practice recently. And both the whole CB and its individual components are used for therapeutic application. CB red blood cells have number of structural features, which allow using them in clinical practice. The use of red blood cells is possible only under the availability of its supplies that can be implemented only under the cryoconservation techniques. The most promising are techniques, which eliminate cells' washing out from cryoprotector. The creation of non-washing-out techniques is based on the use of nonpenetrating cryoprotectors that could be polyoxyethylene with m. m. 1500 (PEG-1500). It has been shown earlier that cryoconservation of red blood cells of donor blood, protected by PEG-1500, allows preserving their wholeness after defrosting due to modifications of membrane-cytoskeleton complex.

Since plasma membrane and cytoskeleton protein reticulum of red blood cells of cord blood have its specific features, which discriminate them from donor blood red blood cells, it could be supposed that its resistance to changing of environmental physicochemical factors during the process of freezing-warming, and after its transportation into blood-vascular flow, will be different.

Consequently, the purpose of the research was to determine the changes of lipid asymmetry in membranes of donor and cord blood red blood cells under the influence of nonpenetrating PEG-1500 cryoprotector during the process of freezing-warming.

Research was carried out on red blood cells of human cord and donor blood, stored on "Glugicir" preserving agent.

The PEG-1500 red blood cells have been cold processed in doses to final concentration of 15%. Before and after freezing-warming the level of erythrocytolysis and degree of abnormality of membranes asymmetry has been determined as for phosphatidyl serine expression on the superficies. The results have been evaluated using the *CELLQuest Pro* program for MAC.

The research showed that both test red blood cells clusters and red blood cells clusters, processed by PEG-1500, were characterized by very low percentage of annexinV^+- cells (less than 1%). After freezing-warming the increased percentage of annexinV^+-cells in red blood cells has been determined: in donor blood – up to 17,1±3,5%; the percentage of annexinV^+-cells в in cord blood constituted 11,5±2,9%.

Study of lipid asymmetry in deconservated red blood cells while modeling the process of transfusion showed that the percentage of red blood cells both in donor and cord blood with exposed phosphatidyl serine on the superficies of membrane does not practically differ from the relevant clusters before cryoconservation due to hemolysis of some of cells: donor red blood cells – 15,0±4,5%; cord red blood cells –12,3±3,9% of cells. The obtained results provide the demonstration of distinct correlation between the percentage of annexin-marked cells immediately after defrosting and the level of erythrocytolysis after the cells were transported into physiological condition.

Key words: cord blood, erythrocytes, cryoprotectant PEO-1500, cryopreservation.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.

Стаття надійшла 7. 06. 2013 р.