



УДК 636:612.123:57.086.13

© 2010

Г. Ф. Жегунов, О. Н. Денисова

Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень сохранности клеток после замораживания-оттаивания

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Досліджено проникність мембран еритроцитів ссавців для гліцерину та ДМСО, збереженість еритроцитів коня, бика, собаки та людини після криоконсервування під захистом проникаючих криопротекторів. Показано, що висока збереженість еритроцитів ссавців досягається при використанні ДМСО, оскільки коефіцієнт його проникнення на порядок вищий, ніж для гліцерину.

Длительное хранение различных жизнеспособных клеток и тканей возможно только в условиях криоконсервирования [1]. Известны методы низкотемпературного консервирования эритроцитов человека [2, 3]. Однако они не совершенны и постоянно дорабатываются. В связи с этим важным является сравнительное изучение особенностей действия факторов криоконсервирования на эритроциты различных животных, что необходимо для установления общих механизмов криоповреждения и криозащиты. Актуальным является также разработка методов криоконсервирования эритроцитов домашних животных и использование их в ветеринарной практике. Для эритроцитов животных таких технологий нет. Известно, что эритроциты разных животных имеют особенности строения мембраны и регуляции ионного гомеостаза [4]. Поэтому для новых объектов приходится экспериментально подбирать криопротекторы и состав защитных сред. Известно, что наиболее эффективным криопротектором для эритроцитов человека является глицерин [2, 3], обеспечивающий достаточно высокую степень сохранности клеток, их стабильность и физиологическую полноценность, что позволяет им выполнять свои функции в русле крови после трансфузии. Однако эффективность глицерина и других криопротекторов для криоконсервирования эритроцитов животных, а также особенности их проницаемости неизвестны. Одним из главных подходов в разработке технологий криоконсервирования является изучение проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов, так как именно этот параметр считается критическим и определяет их различную реакцию на факторы низкотемпературного консервирования [1].

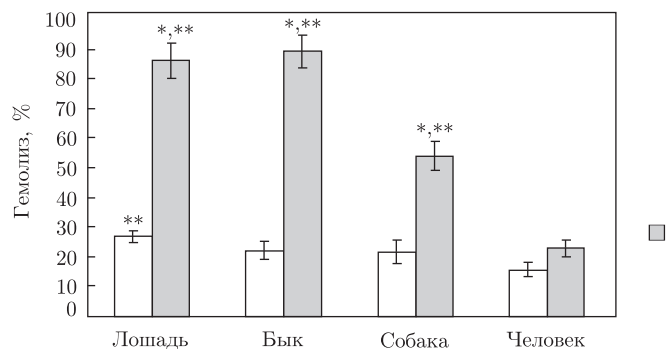


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих после замораживания-отогрева под защитой ДМСО, 10% (□) и глицерина, 15% (■). Результаты представлены как среднее значение \pm средняя ошибка (SEM) из восьми независимых экспериментов. * — $p < 0,01$ относительно клеток, криоконсервированных с ДМСО, ** — $p < 0,05$ относительно эритроцитов человека

Наша цель состояла в оценке проницаемости молекул глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО) в эритроциты домашних животных и определении сохранности клеток после замораживания-оттаивания под защитой этих криопротекторов.

Материалы и методы. Материалом исследования служили эритроциты человека, а также лошади, быка и собаки. Все животные были здоровыми, половозрелыми самцами. Манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.)

Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном консерванте и хранили не более 48 ч при 5 °С до проведения экспериментов. Эритроциты осаждали центрифугированием при 350 g. После удаления плазмы и лейкоцитарного слоя эритроциты трижды промывали 4-кратным объемом изотонического солевого раствора (150 мМ NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4). Для криоконсервирования эритроцитов были использованы следующие криоконсерванты: 20% (w/v) ДМСО; 150 мМ NaCl; 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4 [5]; 30% (w/v) глицерин; 150 мМ NaCl; 5 мМ фосфатный буфер, pH 7,4 [6]. Растворы смешивали с эритро массой в соотношении 1 : 1 по объему. Криоконсервант добавляли к клеточной суспензии при 20–22 °С в течение 10 мин. Замораживание осуществляли путем погружения металлических контейнеров объемом 10 мл в жидкий азот.

Уровень гемолиза определяли как соотношение свободного гемоглобина в надосадке после криоконсервирования к общему содержанию гемоглобина в пробе. Коэффициенты проницаемости эритроцитов для криопротекторов определяли методом светорассеяния, основанным на физико-математической модели гемолиза эритроцитов [7].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что для эритроцитов лошади, быка и собаки уровень гемолиза после замораживания-отогрева с ДМСО колеблется от 20 до 27% (рис. 1), что свидетельствует о хорошей степени сохранности. При этом лучше сохраняются эритроциты собаки, а хуже эритроциты лошади. После криоконсервирования под защитой глицерина уровень гемолиза составляет 60–90%, т. е. сохраняется всего лишь 10–40% эритроцитов млекопитающих в зависимости от вида животного. Таким образом, глицерин не обеспечивает приемлемый уровень защиты эритроцитов животных при использованном режиме замораживания-оттаивания.

Известно, что ДМСО лучше, чем глицерин проникает в большинство биологических объектов [1, 5], что, видимо, и позволяет сохранить достаточное количество эритроцитов

данных животных после замораживания-оттаивания. В связи с этим представляло интерес сопоставить экспериментальные данные о проницаемости мембран эритроцитов для этих криопротекторов.

В табл. 1 приведены результаты измерения коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов домашних животных для проникающих криопротекторов — глицерина и ДМСО, а также значения коэффициента проницаемости эритроцитов человека для данных веществ [8, 9]. Полученные данные свидетельствуют о том, что глицерин очень медленно проникает в клетки всех исследуемых видов домашних животных, а ДМСО проникает в те же эритроциты на порядок быстрее. Аналогичную закономерность установили авторы работ [10, 11], в которых показано, что эритроциты собаки имеют очень низкую проницаемость для глицерина. Таким образом, установлено, что для эритроцитов человека [8, 9] коэффициент проницаемости мембран для глицерина на порядок выше по сравнению с эритроцитами исследуемых нами животных. То есть эритроциты человека являются исключением из изученного ряда эритроцитов млекопитающих. Они обладают низкой проницаемостью для ДМСО и значительно более высокой проницаемостью для глицерина. Это, скорее всего, и обуславливает сохранность эритроцитов человека в процессе криоконсервирования под защитой глицерина.

Известно, что глицерин является довольно гидрофильным веществом: коэффициент его распределения в системе “n-октанол — вода” составляет 0,005, тогда как ДМСО достаточно гидрофобный: его коэффициент распределения составляет 0,25 [8]. Это может объяснить, почему ДМСО значительно легче проникает через липидный бислой в отличие от глицерина.

Проницаемость криопротекторов через липидный бислой мембраны путем диффузии тесно связана также с его текучестью и, следовательно, с содержанием ненасыщенных жирных кислот. Исследование эритроцитов лошади, быка, собаки и человека показало вариации по спектру и распределению жирных кислот, входящих в состав эфиров холестерина, триглицеридов и фосфолипидов, а также фракций свободных жирных кислот (табл. 2). В частности, степень ненасыщенных жирных кислот имеет наибольшее значение в эритроцитах лошади и уменьшается в ряду: лошадь → собака → бык → человек, а индекс двойных связей имеет большее значение для эритроцитов человека [12]. В указанных эритроцитах снижено также молярное соотношение холестерина к фосфолипидам и фосфотидилхолина к сфингомиелину в сравнении с другими видами животных. По представленным показателям можно судить о текучести мембраны, так как известно, что чем больше ненасыщенных жирных кислот, выше соотношение фосфотидилхолина к сфингомиелину и ниже содержа-

Таблица 1. Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов домашних животных и человека (K_c) для ДМСО и глицерина при 20 °С

Млекопитающее	Глицерин	ДМСО
	$K_c \cdot 10^{-7}$, м/с	$K_c \cdot 10^{-5}$, м/с
Лошадь	$0,096 \pm 0,19^{*\dagger}$	$0,516 \pm 0,14^\dagger$
Бык	$0,0525 \pm 0,11^{*\dagger}$	$0,214 \pm 0,18^\dagger$
Собака	$0,046 \pm 0,09^{*\dagger}$	$0,577 \pm 0,12^\dagger$
Человек [8, 9]	$0,38 \pm 0,08^*$	$0,053 \pm 0,16$

Примечание. Результаты представлены как среднее значение \pm средняя ошибка (SEM) из шести независимых экспериментов. * — $p < 0,01$ относительно K_c для ДМСО, † — $p < 0,01$ относительно K_c эритроцитов человека.

Таблица 2. Характеристика липидного состава мембран эритроцитов [12]

Фракция	Лошадь	Бык	Собака	Человек
Ненасыщенные жирные кислоты (мол. % от суммы жирных кислот и сфингозина)	62,4	49,4	51,2	45,6
Холестерин (% всех липидов мембраны)	28,6	28,8	29,5	30
Молярное соотношение холестерина к фосфолипидам	0,92	0,92	0,96	0,8
Молярное соотношение фосфотидилхолина к сфингомиелину	3,14	—	4,34	1,04
Индекс двойных связей для всех липидов мембраны	1,12	1,01	1,32	1,44

ние холестерина, тем значительно повышается текучесть мембраны, а значит, и скорость диффузии гидрофильных молекул. Из приведенных данных видно, что текучесть липидного бислоя выше в эритроцитах человека, поэтому, видимо, и скорость диффузии глицерина через их мембрану более высокая.

С другой стороны, известно, что некоторые вещества проходят через клеточные мембраны со скоростью, значительно превышающей скорость диффузии через липидный бислой. Показано, что обеспечение и регуляция их переноса осуществляется водными каналами (аквапоринами), которые имеют избирательность к проходящим молекулам. Среди 13 известных аквапоринов (AQP) млекопитающих были выделены AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10 как семейство акваглицеропоринов, способных к переносу глицерина [13]. AQP3 идентифицирован как важный канал для транспорта глицерина в эритроцитах человека и крыс [14]. Эритроциты мышей не имеют AQP3, но главным каналом для транспорта глицерина в этих клетках является AQP9 [15]. Для эритроцитов лошади, быка и собаки подобных сведений нет. Возможно, у них отсутствуют данные белковые каналы или они не являются акваглицеропоринами, что также может обуславливать их низкую проницаемость мембран для молекул глицерина.

Таким образом, плохая сохранность эритроцитов домашних животных при их криоконсервировании с глицерином может быть связана с его низкой проницаемостью в клетки. Высокая сохранность эритроцитов лошади, быка и собаки при использованном нами режиме замораживания-отогрева достигается только под защитой ДМСО, так как его проницаемость в исследуемые клетки на порядок выше по сравнению с проницаемостью для глицерина.

1. *Baust J. G., Baust J. M.* Advances in biopreservation. – Boca Raton; London; New York: Taylor and Francis Group, 2007. – 426 p.
2. *Valeri C. R., Srey R., Tilahun D. et al.* The in vitro quality of red blood cells frozen with 40 percent (wt/vol) glycerol at –80 degrees C for 14 years, deglycerolized with the Haemonetics ACP 215, and stored at 4 degrees C in additive solution-1 or additive solution-3 for up to 3 weeks // *Transfusion.* – 2004. – **44.** – P. 990–995.
3. *Wagner C. T., Martowicz M. L., Livesey S. A. et al.* Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // *Cryobiology.* – 2002. – **45.** – P. 153–166.
4. *Red blood cells of domestic mammals / Agar N. S., Board P. G.* – Amsterdam: Elsevier, 1983. – 687 p.
5. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М. и др.* Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1978. – 201 с.
6. *Аграненко В. А., Федорова Л. И.* Замороженная кровь и ее клиническое применение. – Москва: Медицина, 1983. – 96 с.
7. *Gordienko E. A., Gordienko Yu. E., Gordienko O. I.* The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *Cryo Letters.* – 2003. – **26.** – P. 229–244.

8. Гордієнко О. І., Коцій С. В., Лінник Т. П. Проникність мембран еритроцитів людини для гліцерину та його ефірних похідних // *Phys. Alive.* – 2003. – **11.** – Р. 29–36.
9. Гордієнко О. І. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів до 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду // *Пробл. криобіології.* – 2003. – № 1. – С. 38–45.
10. Liu J., Christian J. A., Critser J. K. Canine RBC osmotic tolerance and membrane permeability // *Cryobiology.* – 2002. – **44.** – Р. 258–268.
11. Penninckx F., Poelmans S., Kerremans R. et al. Erythrocyte swelling after rapid dilution of cryoprotectants and its prevention // *Ibid.* – 1984. – **21.** – Р. 25–32.
12. Черницький Е. А., Воробей А. Б. Структура и функция эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 213 с.
13. Agre P., King L., Yasui M. et al. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine // *J. Physiol.* – 2002. – **542.** – Р. 3–16.
14. Yang B., Ma T., Verkman. Erythrocyte water permeability and renal function in double knockout mice lacking aquaporin-1 and aquaporin-3 // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276.** – Р. 624–628.
15. Liu Y., Promeneur D., Rojek A. et al. Aquaporin 9 is the major pathway for glycerol uptake by mouse erythrocytes, with implications for malarial virulence // *PNAS.* – 2007. – **104.** – Р. 12560–12564.

Харьковская государственная
зооветеринарная академия

Поступило в редакцию 09.03.2010

G. F. Zhegunov, O. N. Denisova

Permeability of mammalian erythrocytes for the molecules of glycerol and DMSO and the level of cellular viability after freezing-thawing

We presented the results of investigation of the permeability of membranes of mammalian erythrocytes for glycerol and DMSO and the viability of erythrocytes of horse, cow, dog, and human after the cryopreservation under protection of cryoprotectants. It is shown that a high viability of mammalian erythrocytes is achieved with the application of DMSO, since its permeability is significantly higher than that of glycerol.