



УДК 591.111.1.088.5:547.42

© 2011

В. Н. Кучков, В. Д. Зинченко

## **Количественное определение связанного с эритроцитами лошади криопротектора методом криоскопии**

*(Представлено академиком НАН Украины В. И. Грищенко)*

*За допомогою спеціально розробленого криоскопічного осмометра вимірювали температуру замерзання рідини в суспензії еритроцитів коня після додавання криопротекторів: 1,2-пропандіолу, диметилсульфоксиду та гліцерину. Встановлено, що 1 мл суспензії еритроцитів коня (гематокрит 98%) після багатократного відмивання ізотонічним розчином хлориду натрію містить  $(5,57 \pm 0,24)$  мг 1,2-ПД,  $(4,92 \pm 0,21)$  мг гліцерину та  $(0,93 \pm 0,18)$  мг ДМСО.*

Криопротекторы в большинстве случаев представляют собой химические соединения, не являющиеся естественными метаболитами живых систем. Для успешного криоконсервирования клеток, как правило, требуются значительные концентрации криопротекторов (от единиц до нескольких десятков массовых процентов [1]). Эти вещества не являются инертными к биологическому материалу, они вызывают нарушения структуры и физических свойств фосфолипидного бислоя плазматических мембран, влияют на функционирование ферментных систем и изменяют гидратацию биомакромолекул [2]. Такие взаимодействия, например, с эритроцитами млекопитающих приводят к патологическим заболеваниям, похожим на редкие наследственные нарушения гидратации эритроцитов — гипо- и гипергидратации, известной как гидроцитоз [3]. Частным случаем гидроцитоза является криогидроцитоз [4], характеризующийся мутациями в белке полосы 3 и ионных переносчиках (AE1, SLC4A1) эритроцитов при понижении температуры до 5 °С [5]. В результате отклонения от нормальной гидратации эритроцитов возникают различные типы анемии [4].

Следовательно, количество криопротектора, связанного с эритроцитами, может служить индикатором степени возмущающего действия криопротектора на нативное состояние эритроцитов в целом.

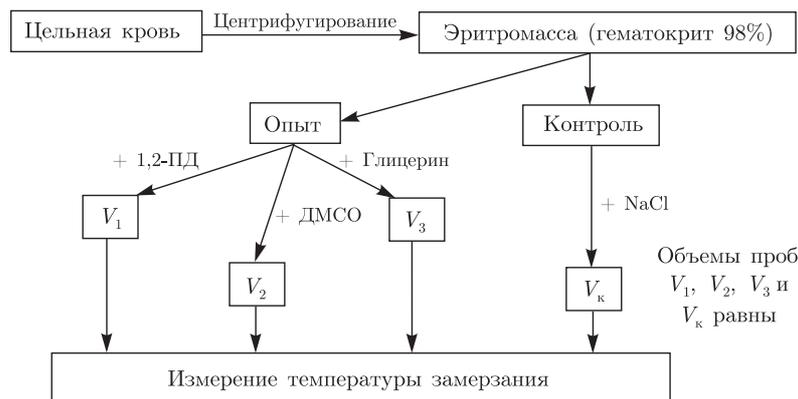


Рис. 1. Общая схема эксперимента по определению количества криопротектора, связанного с эритроцитами, криоскопическим методом

Цель нашего исследования состояла в определении количества 1,2-пропандиола, глицерина и диметилсульфоксида, связанных с эритроцитами лошади и быка, в ходе процедуры удаления данных криопротекторов из суспензии.

Использовали метод криоскопии, при помощи которого измеряли температуру замерзания жидкости в исследуемых образцах. Полученные значения использовали для определения соотношения фракции криопротектора, находящегося в объемной жидкости и связанного с клетками.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на изготовленном в Институте проблем криологии и криомедицины НАН Украины криоскопическом осмометре с разработанной нами криоскопической ячейкой для исследования криобиологических жидкостей. В качестве криопротекторов использовали дополнительно очищенные 1,2-пропандиол (1,2-ПД), глицерин (Гл) и диметилсульфоксид (ДМСО) марки х. ч. ("Реахим", Россия). Образцы цельной крови лошади, стабилизированные гепарином (ЗАТ "БИОЛІК", Украина), были предоставлены сотрудниками Харьковской государственной зооветеринарной академии.

**Результаты и их обсуждение.** Количество связанного криопротектора с эритроцитами лошади и быка определяли по схеме, приведенной на рис. 1. Образцы цельной крови, трижды отмытые в растворе хлорида натрия (150 мМ), разделяли на две пробы (контроль и опыт). К суспензии опытной группы эритроцитов добавляли криопротекторы в концентрации 2,5% таким образом, чтобы объем образца после добавления криопротектора оставался неизменным. Для этого в ходе приготовления образца от суспензии эритроцитов отбирали надосадочную жидкость такого объема, который равен объему добавляемого раствора криопротектора. В контрольной пробе таким же способом добавляли не раствор криопротектора, а физиологический раствор, приготовленный на 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) (рис. 2.). Время инкубирования суспензии эритроцитов всех проб составляло 3 ч при 22 °С. Считается, что такое время инкубирования достаточно для достижения в системе диффузионного равновесия [6]. Показателем достижения диффузионного равновесия было неизменное значение температуры замерзания исследуемых проб.

Удаление криопротекторов из образцов опытной группы осуществляли путем отмывания — многократного центрифугирования суспензии с заменой надосадочной жидкости растворами криопротекторов вдвое меньшей тоничности после каждого центрифугирова-

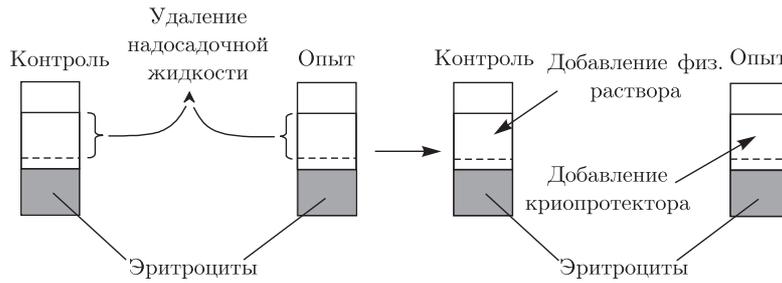


Рис. 2. Схема приготовления образцов для криоскопических исследований

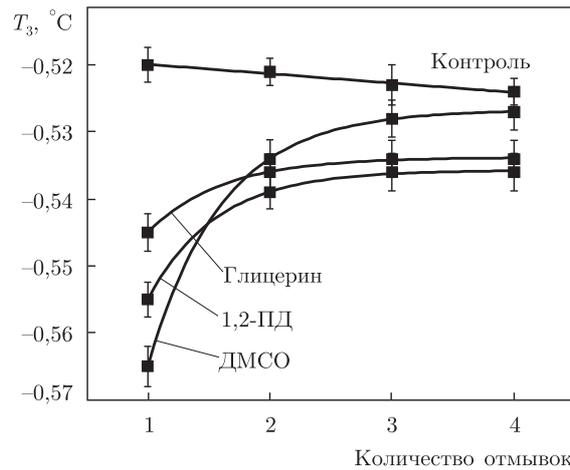


Рис. 3. Изменение температуры заморозки суспензий эритроцитов лошади при отмывании раствором хлорида натрия (контроль) и растворами крипротекторов меньшей тоничности. 3-я и 4-я отмывки осуществляли раствором хлорида натрия (300 мОсм, рН 7,4)

ния. Завершающий этап отмывания проводили физиологическим раствором (рН 7,4). После каждого отмывания измеряли температуру заморозки надосадочной жидкости для того, чтобы выделить вклад крипротектора в понижение температуры заморозки жидкости в системе. Однако нельзя исключать того, что при каждой процедуре отмывания осмотическое состояние системы может изменяться в результате перераспределения других осмотически активных веществ между клеткой и средой. Для учета данного фактора значения температуры заморозки образцов опытной группы сравнивали с контролем, в котором такую же серию отмываний при прочих равных условиях проводили физиологическим раствором, приготовленным на фосфатном буфере (рН 7,4). Полученные значения приведены на рис. 3.

Установлено, что после четырехкратного отмывания суспензии эритроцитов температура заморозки надосадочной жидкости в опытной группе для всех исследуемых крипротекторов была ниже, чем в контрольном образце (см. рис. 3). Поскольку изменение температуры заморозки раствора зависит от концентрации осмотически активных веществ или от активности воды [7], то обнаруженная нами разность температуры заморозки жидкости в контрольном и в опытном образцах отражает содержание крипротектора в системе. Как следует из рис. 3, разность температур заморозки жидкости в контрольном и опытном образцах уменьшается с увеличением количества отмываний и приходит к некоторому постоянному значению на 3–4-м этапе отмывания. Данный факт указывает на существование

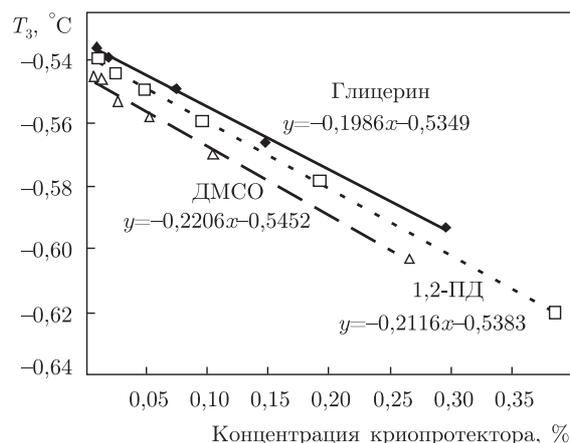


Рис. 4. Зависимость температуры замерзания водных растворов криопротекторов, приготовленных на физиологическом растворе, от концентрации криопротектора

фракции криопротектора, которая не удаляется из суспензии клеток после отмывания их физиологическим раствором.

Количество криопротектора, не удаленного из суспензии, находили исходя из зависимости температуры замерзания раствора криопротектора, приготовленного на физиологическом растворе, от его концентрации (рис. 4). Установлено, что 1 мл суспензии эритроцитов лошади (гематокрит 98%) после многократной отмывки изотоничным раствором хлорида натрия содержит  $(5,57 \pm 0,24)$  мг 1,2-ПД,  $(4,92 \pm 0,21)$  мг глицерина и  $(0,93 \pm 0,18)$  мг ДМСО.

Таким образом, исследование температуры замерзания суспензий эритроцитов лошади в присутствии криопротекторов позволило установить вклад определенного криопротектора в осмотическое состояние системы и оценить фракцию криопротектора, которая не удаляется из суспензии клеток в ходе процедуры отмывания.

1. Fuller B. J., Benson E. E., Lane N. Life in the frozen state. – New York: CRC Press, 2004. – 672 p.
2. Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H. Basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // Cryobiology. – 1990. – **27**, Issue 4. – P. 401–415.
3. Gallagher P. G., Chang S. H., Rettig M. P. et al. Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis // Blood. – 2003. – **101**, No 11. – P. 4625–4627.
4. Delaunay J. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations // Semin. Hematol. – 2004. – **41**. – P. 165–172.
5. Bruce L. J., Robinson H. C., Guizouarn H. et al. Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1 // Nat. Genet. – 2005. – **37**. – P. 1258–1263.
6. Трошин А. С. Распределение веществ между клеткой и средой. – Ленинград: Наука, 1985. – 192 с.
7. Физическая химия. Теоретическое и практическое руководство: Учеб. пособие для вузов / Под ред. Б. П. Никольского. – 2-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: Химия, 1987. – 880 с.

V. N. Kuchkov, V. D. Zinchenko

### Quantitative determination of a cryoprotectant bound with equine erythrocytes by cryoscopy

*With the help of a specially designed cryoscopic osmometer, the freezing temperature of a liquid in suspension of equine erythrocytes in the presence of cryoprotectants (1,2-propanediol, dimethyl sulfoxide, and glycerol) is measured. It is established that 1 ml of equine erythrocytes suspension (haematocrit 98%) after the multiple washing out with an isotonic solution of sodium chloride contains  $5.57 \pm 0.24$  mg 1,2-PD,  $4.92 \pm 0.21$  mg of glycerol, and  $0.93 \pm 0.18$  mg of DMSO.*