

УДК 612.11/12:616.15.092

М. И. Шраго, В. Г. Тимченко, Л. П. Бредихина, В. Г. Лубяный

НЕКОТОРЫЕ ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОХРАННОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ КОНТАКТА С ЭКЗОЦЕЛЛЮЛЯРНЫМИ КРИОПРОТЕКТОРАМИ

Поддержание температурного и химического гомеостаза в организме человека относится к основополагающим представлениям физиологии, и поэтому открытие факта длительной сохранности в жизнееспособном состоянии изолированных клеток теплокровных животных в искусственных условиях глубокого холода поначалу казалось парадоксом. В настоящее время достоверность этого явления не вызывает никаких сомнений. Его всестороннее изучение значительно расширило понятия о криоповреждении, криорезистентности и криозащите биологических структур и увенчалось разработкой эффективных практических методов для их низкотемпературного консервирования.

На современном уровне развития низкотемпературного консервирования большой интерес представляет установление степени повреждения и сохранности клеток на этапах консервирования, выяснение степени обратимости наблюдаемых изменений клеточного статуса и дальнейшее совершенствование методов.

В общем виде в процессе низкотемпературного консервирования различают определенные этапы, на каждом из которых возможно повреждение клеток: 1) получение полноценного клеточного материала и хранение при положительных температурах (от 20° до —40° С); 2) создание криобиологической системы — суспензии клеток в растворе криопротектора, подготовленной к воздействию холода; 3) замораживание клеточной взвеси; 4) хранение в замороженном состоянии; 5) оттаивание; 6) восстановление клеток, подготовка к переливанию.

На примере эритроцитов мы рассматриваем некоторые особенности этапа создания криобиологической системы, связанные с контактом клеток с криопротекторами преимущественно экзоцеллюлярного действия — полиэтиленоксидами (ПЭО) различного молекулярного веса и свойств. Необходимо отметить, что в ряду полимергомологов ПЭО характер взаимодействия этих веществ зависит от молекулярного веса: низкомолекулярные соединения являются эндоцеллюлярными криопротекторами, в то время как при повышении молекулярного веса до 1000 и выше они теряют способность проникать внутрь клеток и действуют по типу экзоцеллюлярных криопротекторов. На примере ПЭО проведен выбор оптимального варианта криопротекторной системы с постановкой для этого последовательного ряда функциональных тестов.

Методика исследований

В экспериментах исследовали 24-часовые донорские эритроциты, полученные отстаиванием крови в холодильнике при 4° С с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 60—80 g. Изучали криопротекторы полиэтиленоксиды с молекулярным весом 100, 400, 1000, 1500, 4000. Систему эритроциты — криопротектор готовили смешиванием

эритроцитов с 20—30% раствором криопротектора 1:1, время экспозиции 1 ч при комнатной температуре.

Для изучения повреждающего действия криопротекторов пробы центрифугировали 15 мин при 60—80 g и исследовали надосадочную жидкость и эритроциты осадка.

Для оценки клеточного статуса эритроцитов в настоящее время применяют следующие тесты: 1) содержание гемоглобина в надосадочной жидкости после центрифугирования клеточной взвеси фотокалориметрическим методом по [2]; 2) определение процента сохранившихся клеток; 3) осмотическую резистентность клеток в растворах разной концентрации хлористого натрия и хлористого калия; 4) определение содержания калия и натрия в эритроцитах и в надосадочной жидкости после центрифугирования клеточной взвеси методом пламенной фотометрии; 5) определение концентрации 2,3-дифосфоглицериновой кислоты в эритроцитах по [1]; 6) кислородную емкость и кривые диссоциации оксигемоглобина газометрическим методом на приборе Ван-Слайка.

Результаты исследований

Как известно, уже первые признаки повреждения клеток можно обнаружить с самого начала их хранения *in vitro*, и интенсивность их нарастает по мере удлинения сроков консервирования. Комплекс указанных признаков получил название «повреждение от хранения» [5]. Такие клетки подвергаются в последующем инкубации в растворах чуждых им субстанций — криопротекторах, и вследствие контакта с ними приобретают новые качества, повышая свою резистентность к экстремальным воздействиям — замораживанию и оттаиванию. При этом необходимо оценить функциональный статус объекта. В конкретных условиях задача сводится к подбору тестов оценки морфологического и функционального состояния клетки, адекватно характеризующих степень повреждения либо сохранности ее, и последовательности их постановки. Причем, испытания должны выявить как явные, так и скрытые признаки повреждения. Такие тесты необходимы при выборе криопротектора.

К явным признакам повреждения эритроцитов относится гемолиз, который можно оценить по содержанию гемоглобина в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования клеточной взвеси, либо по проценту сохранившихся клеток, используя формулу [4]:

$$\frac{Hb \text{ в осадке сохранившихся клеток}}{Hb \text{ в надстое + } Hb \text{ в осадке}} \times 100.$$

При изучении гемолизирующего действия различных ПЭО нами установлено, что 20—30% концентрация ПЭО с молекулярным весом — 100—400 вызывает гемолиз эритроцитов, в то время как после контакта с ПЭО с молекулярным весом 1000—4000 этот эффект ослабевает. По-видимому, гемолиз эритроцитов в растворах ПЭО с низким молекулярным весом связан с частичным проникновением их внутрь клетки, соответствующим снижением концентрации вещества в околоклеточной среде, а также с различием скоростей эндо-экзоосмоса и развитием градиента осмотического давления по обеим сторонам клеточной мембраны. Кроме того, причиной повреждения эритроцитов в растворах ПЭО с молекулярным весом 100—400 может служить также осмотический шок, так как осмотическое давление испытываемых растворов в семь и более раз превосходит изоосмию. Осмотическое давление растворов высокомолекулярных ПЭО (1000—4000) лежит в пределах 11—16 атм. Однако, по-видимому, этим не исчерпывается наблюдаемый феномен, т. к. включение в растворы низкомолекулярных ПЭО (100—400) 1% раствора хлористого натрия предупреждает развитие явного гемолиза.

При отсутствии явного гемолиза для выявления возможного скрытого повреждения клетки целесообразна постановка проб «с функциональной нагрузкой». К таким пробам следует в первую очередь отнести оп-

ределение осмотической хрупкости (резистентности) эритроцитов в растворах хлористого натрия разной концентрации.

В предыдущих исследованиях [3] нами было показано, что полиэтиленоксид с молекулярным весом 4000 повышает в 1,5—2 раза резистентность эритроцитов к гипертоническим (10%) растворам хлористого натрия.

Нами проведено изучение показателей осмотической резистентности эритроцитов в гипотонических растворах хлористого натрия после



пребывания их в негемолизирующих растворах ПЭО с различным молекулярным весом (см. рисунок).

Полученные данные показали, что ПЭО с молекулярным весом в пределах 1000—4000 не изменяют величины максимальной и минимальной осмотической резистентности эритроцитов, амплитуду этих показателей и зону прочности. ПЭО с низким (100—400) и более высоким (6000) молекулярным весом повышают осмотическую хрупкость эритроцитов. Следовательно, растворы ПЭО с молекулярным весом 1000—4000, повышающие резистентность эритроцитов к гипертоническим растворам хлористого натрия, не понижают выносливости их к гипотоническим растворам.

Для того, чтобы убедиться в том, что в основе наблюдаемого явления лежат только осмотические взаимодействия, мы включили в аналогичных опытах действие растворов хлористого калия, равных по осмотическому давлению растворам хлористого натрия. При этом не отмечено полного соответствия и таким образом выяснилось, что наряду с осмотическими взаимоотношениями резистентность эритроцитов зависит также от природы компонента, обеспечивающего заданное давление.

Показатели осмотической резистентности эритроцитов в растворах хлористого калия изменяются в сторону повышения показателей максимальной и минимальной резистентности, значительного сужения ее амплитуды, т. е. снижения осмотической резистентности эритроцитов, по сравнению с аналогичными показателями в растворах хлористого натрия.

Таким образом, гипотонические растворы хлористого калия представляют собой более жесткие условия «функциональной нагрузки» для эритроцитов, чем те же растворы хлористого натрия, и выявляют повреждение их в изотонической среде.

Дальнейшему исследованию подвергали растворы криопротекторов, которые не оказывали как явного, так и латентного гемолизирующего действия на эритроциты.

В основе повреждения эритроцитов лежит повышение проницаемости клеточной мембраны для различных компонентов клеточного содержимого: воды, ионов, энзимов, липопротеидов, белков [6]. Появление

Показатели сохранности эритроцитов после контакта с растворами ПЭО в сравнении с контролем ($n=12$)

Исследуемые показатели	Контроль	Растворы криопротекторов (конечная концентрация во взвеси)							
		ПЭО-400		ПЭО-1000		ПЭО-1500		ПЭО-4000	
		15%	p	15%	p	10%	p	10%	p
Свободный H_2O в надосадочной жидкости, $мг\%$	$7,21 \pm 0,40$	$7,82 \pm 1,16$	$>0,5$	$6,30 \pm 0,86$	$>0,25$	$6,79 \pm 0,82$	$>0,5$	$3,80 \pm 0,6$	$<0,001$
Гематокрит, %	$42,47 \pm 0,39$	$25,33 \pm 0,90$	$<0,001$	$25,44 \pm 0,80$	$<0,001$	$29,75 \pm 1,07$	$<0,001$	$23,72 \pm 1,13$	$<0,001$
Гемолиз, %	$0,07 \pm 0,013$	$0,05 \pm 0,009$	$>0,25$	$0,05 \pm 0,01$	$>0,25$	$0,04 \pm 0,008$	$>0,05$	$0,04 \pm 0,02$	$>0,1$
% восстановленных клеток	$99,97 \pm 0,004$	$99,97 \pm 0,003$	$>0,5$	$99,97 \pm 0,004$	$>0,5$	$99,97 \pm 0,0098$	$>0,5$	$99,97 \pm 0,005$	$>0,5$
Осмотическая хрупкость в 0,6% NaCl, %	$3,28 \pm 0,64$	$94,95 \pm 1,50$	$<0,001$	$8,62 \pm 1,79$	$<0,01$	$6,08 \pm 1,07$	$<0,05$	$5,85 \pm 2,00$	$>0,1$
Содержание K^+ в надосадочной жидкости, $мэкв/л$	$3,76 \pm 0,48$	$1,88 \pm 0,1$	$<0,02$	$3,59 \pm 0,80$	$>0,5$	$2,55 \pm 0,15$	$<0,05$	$1,96 \pm 0,12$	$<0,01$
pH	$7,15 \pm 0,11$	$7,10 \pm 0,14$	$>0,25$	$7,05 \pm 0,14$	$>0,05$	$6,95 \pm 0,09$	$<0,001$	$6,93 \pm 0,2$	$<0,01$
Содержание 2,3-ДФГ, $мкмоль/мл$ эритроцитов	$7,45 \pm 0,57$	$5,7 \pm 0,83$	$>0,1$	$7,39 \pm 0,80$	$>0,5$	$8,98 \pm 1,19$	$>0,25$	$8,24 \pm 1,10$	$>0,5$
P_{50} , $мм$ рт. ст.	$27,92 \pm 0,87$	—	—	—	—	$24,8 \pm 1,0$	$=0,05$	$27,54 \pm 0,57$	$>0,5$

гемоглобина в надосадочной жидкости свидетельствует о повышении мембранной проницаемости эритроцитов для белка — гемоглобина, возникающей на последних этапах деградации клетки. Выходу из клетки белка предшествует выход воды и ионов. С этой целью следующим этапом в изучении скрытого повреждающего действия криопротекторов на эритроциты было изучение содержания внутриклеточного калия по его содержанию в надосадочной жидкости.

Было установлено (см. таблицу), что после пребывания эритроцитов в растворах криопротекторов наблюдался выход калия из клеток в надосадочную жидкость (в среднем около 0,5% при нормальном содержании калия в эритроцитах 420 мэкв/л). Максимальная потеря калия из эритроцитов (7,2%) наблюдалась после пребывания эритроцитов в 30% растворе ПЭО с молекулярным весом 1500.

Вслед за изучением выхода калия из эритроцитов после воздействия криопротекторов рассмотрим действие растворов ПЭО на органический фосфат, участвующий в выполнении специфической функции эритроцитов — транспорте кислорода. В качестве теста было выбрано определение концентрации 2,3-дифосфоглицериновой кислоты в эритроцитах после их обработки ПЭО с различным молекулярным весом.

Уровень 2,3-ДФГ после воздействия ПЭО с молекулярным весом 400 снижался на 37%, а после воздействия ПЭО с молекулярным весом 1500 — повышался на 20%, что определенным образом должно сказываться на кислородтранспортной функции эритроцитов и может быть выявлено при ее исследовании.

Таким образом, как показано в опытах с растворами ПЭО, различные воздействия на эритроциты консервированной крови могут вызвать явные и латентные повреждения их. Первые определяются по степени гемолиза после инкубации клеток в испытуемой среде. Вторые для обнаружения требуют специальных тестов, включающих определенные функциональные нагрузки, к ним следует отнести: определение осмотической резистентности эритроцитов в гипотонических растворах хлористого натрия. Эти исследования целесообразно дополнить изучением осмотической резистентности эритроцитов в гипотонических растворах других веществ, например хлористого калия, являющегося основным ионом эндоцеллюлярной жидкости. Эта информация дает представление о сохранности мембраны клетки. Следующий этап испытаний (изучение содержания в эритроцитах ионов калия и натрия, 2,3-дифосфоглицериновой кислоты, кислородтранспортной функции) дает представление о степени повреждения мембраны на догемолитической стадии.

Литература

1. Луганова И. С., Блинов М. Н. Определение 2,3-дифосфоглицериновой кислоты не-энзиматическим методом и содержание 2,3-дифосфоглицерата и АТФ в эритроцитах больных хроническим лимфолейкозом. — Лабор. дело, 1975, № 11, с. 652—655.
2. Рождественская М. А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови. — Актуальные вопросы переливания крови, 1955, № 4, с. 55—57.
3. Шраго М. И. О противогемолитическом действии криопротекторов. — Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины, Киев, «Наукова думка», 1974, с. 101—104.
4. Hanstam R. G., Ikin E. W., Harn B. A. Blood groups and enzymes of human red cells after a year's storage in liquid nitrogen. — Brit. Med. J., 1962, N 11, p. 1508—1514.
5. Murphy J. R., The erythrocytes metabolism. — J. Lab. and Clin. Med., 1960, 55, N 2, p. 281—286.
6. Woolgar A. E. Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing polyvinylpyrrolidone relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements. — Cryobiology, 1974, 11, N 1, 52—59.