

УДК 577.352.462:57.043:547.422

*О.В. Вязовская, А.В. Николенко**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков***СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ И НАТРИЯ В ЭРИТРОЦИТАХ ДО И ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ В КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕДАХ НА ОСНОВЕ ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО МЕТИЛЦЕЛЛОЗОЛЬВА**

Для оценки эффективности криозащитных сред на основе непроницающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллозоля изучали внутриклеточное содержание ионов калия и натрия в эритроцитах человека до и после замораживания. Выявлена зависимость исследуемых показателей, отражающих сохранность эритроцитов, от состава криозащитных сред. Установлена корреляция внутриклеточного содержания калия и натрия с осмотической хрупкостью эритроцитов в гипотонической среде после замораживания.

Ключевые слова: эритроциты, калий, натрий, осмотическая хрупкость, замораживание, оксиэтилированный метилцеллозольв.

Ионы калия и натрия имеют первостепенное значение для поддержания мембранного потенциала, участвуют в функционировании внутриклеточных ферментов, поддержании осмотического, кислотно-основного гомеостаза, а также в ряде метаболических процессов [1, 2]. Внутриклеточное содержание ионов в эритроцитах является одним из значимых показателей, отражающих состояние энергетических систем и трансмембранных процессов клетки, то есть структурно-функциональный статус эритроцитов как на этапе экспозиции, так и после замораживания клеток в криозащитных средах. Криоконсервирование эритроцитов приводит к значительным изменениям внутриклеточного содержания катионов: клетки обогащаются Na^+ и теряют при этом K^+ , что связано с образованием микродефектов мембраны [3].

Физико-химические свойства криозащитных сред – осмолярность и ионная сила, которые определяются содержанием входящих в среду компонентов, являются значимыми факторами, влияющими на целостность мембраны клеток [4, 5].

Целью исследования явилось изучение внутриклеточного содержания ионов K^+ и Na^+ в эритроцитах до и после замораживания в криозащитных средах на основе оксиэтилированного метилцеллозоля.

Материал и методы. Эритроциты получали из донорской крови человека, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгидир» и хранившейся не более двух суток в холодильнике. Исследовали криозащитные среды на основе оксиэтилированного метилцеллозоля (ОЭМЦ) – криопротектора экзоцеллюлярного механизма действия, полученного путём модификации метилцеллозоля (метилового эфира этиленгликоля) включением в его молекулу этоксигрупп ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), $n=33-35$, где n – степень полимеризации. Химическая формула: $\text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{33-35}\text{H}$. Очистка и идентификация криопротектора проводилась в Институте проблем криобиологии и криомедицины. В качестве криозащитных сред использовали 20 и 30% -ные ОЭМЦ, приготовленные на 50 и 150 мМ растворах NaCl (чда), 20% -ные ОЭМЦ – на 100 мМ NaCl с добавлением 3 % сахарозы (чда) на 50 мМ NaCl с добавлением 5 % глюкозы (чда) и на 50 мМ NaCl с 5% -ным маннитом (чда). Растворы добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1 со скоростью 1 мл/мин, помешивая, при температуре 20–22 °С. Продолжительность экспозиции – 45 мин. Затем взвесь эритроцитов с криозащитными средами переводили в пластиковые контейнеры вместимостью 2 мл и замораживали путём погружения в жидкий

© О.В. Вязовская, А.В. Николенко, 2012

азот. Исследуемые образцы эритроцитов отогревали на водяной бане при 40–42 °С. Содержание внутриклеточного калия и натрия измеряли на пламенном фотометре ПАЖ-1 в образцах эритроцитов объемом 150 мкл (с пересчетом на 100% -ный гематокрит). Показатели оценивали до замораживания после экспозиции клеток в криозащитных средах относительно контроля – эритроцитов, инкубированных в изотоническом растворе, а также после замораживания-отогрева относительно значений, полученных до замораживания после экспозиции клеток со средами. Гематокрит определяли в капиллярах с использованием микроцентрифуги МГЦ-8. Показатели осмотической хрупкости (процент разрушенных клеток после их помещения в 0,6% -ный раствор NaCl) измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм и рассчитывали относительно 100% -ного гемолиза. Ионную силу рассчитывали по формуле Льюиса. Цифровые данные статистически обрабатывали с использованием критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение. Увеличение осмолярности криозащитной среды,

которое определялось возрастанием содержания криопротектора или соли, приводило к увеличению дегидратации эритроцитов, что отражалось на устойчивости клеток к замораживанию. Содержание калия и натрия в исследуемых образцах эритроцитов изменилось после экспозиции с криозащитными средами в зависимости от состава последних (таблица). Так, содержание калия достоверно увеличилось после экспозиции со средами, содержащими 20 и 30 % ОЭМЦ, приготовленными на 150 мМ NaCl, а также со средой, содержащей 20 % ОЭМЦ на 100 мМ NaCl, с добавлением сахарозы. Со всеми средами, приготовленными на 50 мМ NaCl, имеющими более низкую ионную силу раствора, достоверного увеличения внутриклеточного содержания калия не обнаружено (таблица). Это может быть связано с разной степенью дегидратации клеток криозащитными средами, приводящей к уменьшению их объема и, как следствие, изменению количества клеток в исследуемых образцах. Ранее нами была показана корреляционная зависимость содержания калия после замораживания в исследуемых образцах с показателями гематокрита, в

Показатели сохранности эритроцитов в зависимости от состава криозащитной среды

Состав криозащитных сред	Ионная сила криозащитных сред, моль/л	Внутриклеточное содержание, ммоль/л				Осмотическая хрупкость в 0,6% -ном NaCl после замораживания, %
		ионов калия		ионов натрия		
		до замораживания	после замораживания	до замораживания	после замораживания	
Контроль, 150 мМ NaCl	0,15	87,47±4,73		16,12±4,8		
20 % ОЭМЦ, 50 мМ NaCl	0,05	96,40±7,55	67,52±2,82 [#]	19,33±2,54	29,55±6,61	29±3
20 % ОЭМЦ, 100 мМ NaCl, 3 % сахарозы	0,103	108,35±7,14*	78,83±5,94 [#]	25,56±2,24*	33,97±2,05 [#]	25±3
20 % ОЭМЦ, 50 мМ NaCl, 5 % маннита	0,05	105,63±12,77	86,32±9,51	28,33±1,64*	23,55±4,38	22±2
20 % ОЭМЦ, 50 мМ NaCl, 5 % глюкозы	0,05	99,73±6,23	83,45±6,13	21,04±3,57	23,27±2,47	24±2
20 % ОЭМЦ, 150 мМ NaCl	0,15	117,05±10,73*	74,75±2,76 [#]	21,58±6,33	46,11±3,44 [#]	36±1
30 % ОЭМЦ, 50 мМ NaCl	0,05	99,19±0,92	56,46±4,02 [#]	32,17±4,88*	40,04±4,28	46±4
30 % ОЭМЦ, 150 мМ NaCl	0,15	106,22±1,14*	48,36±7,95 [#]	37,11±2,98*	55,01±6,1 [#]	57±4

Примечания: 1. После замораживания в контроле – полный гемолиз.

2. p≤0,05; * достоверность различий относительно контроля, # относительно значений после экспозиции до замораживания.

значительной мере отражающего степень дегидратации клеток на этапе экспозиции [6].

Изменение внутриклеточного содержания натрия на этапе экспозиции также определялось составом среды. Наблюдалось его достоверное увеличение после экспозиции эритроцитов со средами, содержащими 30 % ОЭМЦ, приготовленными как на 50 мМ, так и на 150 мМ NaCl. Выявлено достоверное, однако менее выраженное увеличение внутриклеточного содержания натрия в средах, содержащих 20 % ОЭМЦ, с добавлением сахарозы и маннита. Среда, включающие глюкозу, не вызывали изменения содержания внутриклеточного натрия (таблица).

Значимым фактором, влияющим на сохранность эритроцитов после замораживания, является ионная сила, определяемая содержанием солей в криозащитной среде. Снижение концентрации соли (NaCl) со 150 до 50 мМ в криозащитной среде на основе 30 % ОЭМЦ приводило к повышению сохранности калия в эритроцитах после замораживания с 45,53 до 56,92 %. Снижение концентрации NaCl со 150 до 50 мМ в среде на основе 20 % ОЭМЦ также способствовало увеличению сохранности внутриклеточного калия после замораживания-отогрева с 63,04 до 70,04 %. При этом сохранность калия в эритроцитах была больше в средах, содержащих 20 % ОЭМЦ, приготовленных и на 150 и на 50 мМ NaCl, по сравнению со средой, содержащей 30 % ОЭМЦ. Содержание внутриклеточного натрия в клетках, замороженных в 20 % ОЭМЦ, приготовленном на 150 и 50 мМ NaCl, увеличилось в 2 и 1,5 раза соответственно относительно значений до замораживания после экспозиции эритроцитов в исследуемых средах. Следует отметить, что в средах, содержащих 30 % ОЭМЦ, увеличение внутриклеточного содержания натрия в эритроцитах было значительным уже на этапе экспозиции (таблица).

Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о том, что снижение концентрации соли со 150 до 50 мМ NaCl в средах, содержащих 30 и 20 % ОЭМЦ, приводило к меньшей потере внутриклеточного калия и снижению количества вошедшего в клетку натрия после замораживания. При этом лучшая сохранность эритроцитов по всем показателям отмечалась при использовании криозащитных сред на основе 20 % ОЭМЦ.

Замещение электролита (NaCl) неэлектролитами – глюкозой, сахарозой и манни-

том, в криозащитных средах на основе 20 % ОЭМЦ способствовало повышению сохранности криоконсервированных эритроцитов (таблица). Содержание калия в образцах эритроцитов после замораживания-отогрева составляло 72,75; 81,72 и 83,68 % с криозащитными средами, содержащими, соответственно, сахарозу, маннит и глюкозу относительно значений до замораживания. Достоверное увеличение содержания внутриклеточного натрия после замораживания наблюдалось в эритроцитах, замороженных со средой, содержащей сахарозу, тогда как со средами, содержащими маннит и глюкозу, достоверных различий относительно значений после экспозиции обнаружено не было, что свидетельствует о высокой сохранности эритроцитов после замораживания с данными средами. Это подтверждается показателями осмотической хрупкости (таблица). В работах [6, 7] показано, что углеводы снижают осмотическую нагрузку на клетки, оказывают мембраностабилизирующее действие, что является благоприятным фактором для повышения криоустойчивости клеток. Присутствие в среде глюкозы, вероятно, является дополнительным источником АТФ, что активирует АТФ-зависимый транспорт ионов.

Установлена положительная корреляция ионной силы исследуемого ряда криозащитных сред с содержанием внутриклеточного натрия после замораживания ($k=0,85$; $p=0,01$), тогда как со значениями содержания натрия перед замораживанием корреляционной зависимости не выявлено. Эритроциты после экспозиции в средах, содержащих 30 % ОЭМЦ, более чувствительны в увеличению ионной силы среды, чем эритроциты после экспозиции со средами, содержащими 20 % ОЭМЦ. Это может свидетельствовать о том, что чувствительность эритроцитов к ионной силе среды на этапе экспозиции связана с концентрацией криопротектора (таблица). После замораживания клетки более чувствительны к повышению соли в среде; в большей или меньшей степени нарушаются механизмы, поддерживающие концентрационные градиенты исследуемых ионов до исходных значений во всех средах. Клетка не может в полной мере сопротивляться повышенной ионной силе криозащитной среды, и, как следствие этого, происходит потеря клетками внутриклеточного калия и увеличение концентрации внутриклеточного натрия.

Виявлена кореляція содержания внутріклеточного калія, натрія і осмотическої хрупкості після замороживання еритроцитів в залежності від складу криозащитної середовища. Після замороживання содержание калія отрицательно кореліровало с содержанием натрія ($k=-0,79$; $p<0,03$), що указує на сопряженність механізмів перераспределения ионов калія і натрія.

Утечка калія після замороживання і підвищення содержания натрія в клітці являлись следствием нарушения целостности мембрани, которое проявлялось при помещении клеток в гипотоническую среду (0,6% -ный NaCl) – показателя, характеризующего осмотическую резистентность эритроцитов. Виявлена достовірність кореляція значень осмотичесеской хрупкості с внутріклеточным содержанием калія ($k=-$

$-0,94$; $p=0,001$) і натрія ($k=0,9$; $p=0,006$) після замороживання–отогрева.

Выводы

Показатели внутріклеточного содержания калія і натрія, отражающие структурно-функциональное состояние эритроцитов, свидетельствуют о влиянии фактора криозащитной среды на сохранность эритроцитов до и после замороживання.

Полученные в работе данные указывают на высокую чувствительность систем транспорта катионов к действию низких температур. После замороживання эритроцитов со средами, содержащими глюкозу и маннит, не выявлено достовірності изменения в содержании внутріклеточного калія і натрія до и после замороживання, что свидетельствует о высокой криозащитной эффективности этих сред.

Список литературы

1. Crawford A. Balancing act: Na+ Sodium K+ Potassium / A. Crawford, H. Harris // Nursing. – 2011 July. – Vol. 41, Issue 7. – P. 44–50.
2. Edwards S. Regulation of water, sodium and potassium: implications for practice / S. Edwards // Nursing Standard. – 2001. – Vol. 15, № 22. – P. 36–42.
3. Гулевский А. К. Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования : автореф. дис. на соискание уч. степени докт. биол. наук / А. К. Гулевский. – Харьков, 1986. – 41 с.
4. Песина Н. И. Осмолярность среды и продолжительность инкубации как два независимых фактора, контролирующих чувствительность эритроцитов к охлаждению в средах, содержащих неэлектролит / Н. И. Песина, В. А. Бондаренко // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем. – Харьков, 1989. – С. 19–26.
5. Поздняков В. В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук / В. В. Поздняков. – Харьков, 1989. – 16 с.
6. Сравнительная оценка содержания калія в эритроцитах человека до и после замороживання в криозащитных средах на основе непроникающих криопротекторов / А. В. Николенко, О. В. Вязовская, В. В. Чеканова, А. М. Компаниец // Матер. VI Междунар. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии» БФФХ. – Т. 2. – Биофизика и биофизическая медицина. – Севастополь, 2010. – С. 23–24.
7. Stabilization of dry membrane by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification / H. Grove, A. E. Oliver, F. A. Yoekstra, L. M. Grove // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, Issue 1. – P. 20–30.
8. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization / G. R. Satpathy, Z. Torok, R. Bali [et al.] // Cryobiology. – 2004. – Vol. 49, Issue 2. – P. 123–136.

О.В. В'язовська, О.В. Ніколенко

ВМІСТ ІОНІВ КАЛІЮ І НАТРІЮ В ЕРИТРОЦИТАХ ДО І ПІСЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ В КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩАХ НА ОСНОВІ ОКСІЕТИЛЬОВАНОГО МЕТИЛЦЕЛОЗОЛВУ

Для оцінки ефективності криозахисних середовищ на основі непроникаючого криопротектора оксіетильованого метилцелозольву (ОЕМЦ) вивчали внутрішньоклітинний вміст іонів калію і натрію в еритроцитах людини до і після замороживання. Виявлено залежність досліджуваних показників, що відображають збереження еритроцитів, від складу криозахисних середовищ. Встановлена кореляція внутрішньоклітинного вмісту калію і натрію з осмотичною крихкістю еритроцитів у гіпотонічному середовищі після замороживання.

Ключові слова: еритроцити, калій, натрій, осмотична крихкість, замороживання, оксіетильований метилцелозольв.

O.V. Vyazovskaya, A.V. Nikolenko

CONTENT OF POTASSIUM AND SODIUM IONS IN ERYTHROCYTES BEFORE AND AFTER FREEZING IN CRYOPROTECTIVE MEDIA BASED ON OXYETHYLATED METHYL CELLOSOLVE

To assess effectiveness of the cryoprotective media based on non-penetrating cryoprotectant oxyethylated methyl cellosolve (ОЕМС) we measured intracellular concentration of potassium and sodium ions before and after freezing in human erythrocytes. The parameters, which reflect red blood cells preservation, were shown to depend on the composition of cryoprotective medium. A correlation was found between intracellular potassium and sodium content and osmotic fragility of erythrocytes in hypotonic medium after freezing.

Key words: *erythrocytes, potassium, sodium, osmotic fragility, freezing, oxyethylated methylcellosolve.*

Поступила 10.08.11