

МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ В КОМБИНИРОВАННЫХ КРИОКОНСЕРВАНТАХ***В.В. Рамазанов¹, Е.Л. Воловельская², В.А. Бондаренко³***^{1,2,3}Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина

Исследовали криозащитную эффективность непроникающих полимеров (декстран, ПЭГ-1500) и комбинированных сред, содержащих полимеры и проникающие криопротекторы (ДМСО, 1,2-ПД). Установлено, что гемолиз эритроцитов под действием катионного детергента ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромид) значительно подавляется при включении в среду декстрана или ПЭГ-1500. В то же время, присутствие в среде модификатора белка полосы 3 ДИДС (диизотиоцианато-стильбен-дисульфонат) вызывает рост чувствительности эритроцитов к действию данного детергента независимо от присутствия указанных неэлектролитов. Гемолиз эритроцитов под действием неионного детергента Твин-20 показал, что декстран и ПЭГ-1500 незначительно снижают чувствительность клеток к данному детергенту. В то же время, ДИДС приводит к снижению чувствительности клеток к Твин-20 независимо от состава среды [2]. В мембране белок полосы 3 находится в димерных и тетрамерных формах [11]. Диссоциация тетрамеров на димеры при связывании ДИДС приводит к увеличению площади гидрофобного контакта белка полосы 3 с липидами [12]. Вместе с тем, связывание цитоскелета с мембраной опосредуется тетрамерными формами белка полосы 3 [11]. Необходимо отметить, что гемолитическое действие ЦТАБ осуществляется в молекулярной форме, тогда как действие Твин-20 – в мицеллярной форме [8]. Поскольку при связывании с мембранами эритроцитов ДИДС вызывает диссоциацию тетрамеров белка полосы 3 на димеры [11], он может способствовать действию ионных детергентов, которые производят сольubilизацию мембран и гидрофобных мембранных белков [9]. При диссоциации тетрамеров на димеры площадь гидрофобного контакта протеин-липид увеличивается [12], поэтому действие неионных детергентов на мембраны может ослабляться, так как они сольubilизирует в основном липиды [7]. ДИДС усиливает действие ионного детергента ЦТАБ и ослабляет действие неионного детергента Твин-20 в средах, содержащих полимерные криопротекторы, которые в свою очередь подавляют гемолиз.

На основании описанных результатов можно предположить, что полимеры стабилизируют тетрамерные формы белка полосы 3, что приводит к усилению взаимодействия цитоскелета с мембраной. Несмотря на данное упрочнение мембраны, эритроциты, после замораживания в средах, содержащих полимеры морфологически представлены сферocyтами и являются осмотически хрупкими [3, 5, 6]. Следовательно, среды, содержащие декстран или ПЭГ-1500, не обладают достаточной криозащитной эффективностью.

При быстром замораживании эритроцитов в жидком азоте (300°С/мин) в среде, содержащей декстран или ПЭГ-1500, значительная степень повреждения и нарушение осмотических и морфологических характеристик определяется гипертоническим и осмотическим (постгипертоническим) стрессом при охлаждении и оттаивании [1, 4, 10]. Для ослабления указанных повреждающих факторов в среду с непроникающим полимером необходимо включить проникающий криопротектор (ДМСО или 1,2-ПД). Поступление в эритроциты проникающих криопротекторов обеспечивает ослабление дегидратации и действия гипертонического стресса на клетки при охлаждении, что является условием для сохранения устойчивости эритроцитов к осмотическому (постгипертоническому) стрессу при оттаивании [1, 4]. Это дает возможность получать клетки с удовлетворительными осмотическими и морфологическими характеристиками

после их отмывания от криоконсерванта [3, 5, 6].

Таким образом, экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что для эффективной криопротекции эритроцитов криоконсервант должен содержать комбинацию непроникающего и проникающего криопротекторов. Положительный эффект проникающего компонента определяется ограничением значительной дегидратации клеток при охлаждении и вымерзании воды во внешнем растворе замораживаемых образцов, тогда как непроникающий компонент при оттаивании обеспечивает предупреждение чрезмерной регидратации и достижения клетками максимально «критического» объема, при котором наступает разрыв мембран. В результате замораживания данный состав обеспечивает высокую степень сохранности клеток. Предложенный механизм стабилизации мембран в комбинированных средах обосновывает использование подобных составов при криоконсервировании других клеток, так как при замораживании-оттаивании они также подвергаются дегидратации-регидратации.

Литература

1. Рамазанов В. В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом / В. В. Рамазанов // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 155–163.
2. Рамазанов В. В. Влияние криопротекторов на устойчивость эритроцитов к детергентам при модификации агрегатного состояния белка полосы 3 / В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 4. – С. 335–346.
3. Рамазанов В.В. Защитная эффективность комбинированных сред с непроникающими и проникающими криопротекторами при замораживании клеток крови / В.В. Рамазанов, Т.И. Дейнеко, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2011. – № 1 (11) – С. 39-45.
4. Рамазанов В.В. Проявление и устранение эффекта «упаковки» в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами / В.В. Рамазанов В.А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 3 – С. 312–323.
5. Рамазанов В.В. Свойства эритроцитов, замороженных в среде с декстраном, диметилсульфоксидом и глюкозой / В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Т. 1, Вип. 3. – С. 241–246.
6. Рамазанов В.В. Свойство эритроцитов, замороженных в среде с полиэтиленгликолем и 1,2-пропандиолом / В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 2, Вип. 3. – С. 230–236.
7. Kragh-Hansen U. The Mechanism of Detergent Solubilization of Liposomes and Protein-Containing Membranes / U. Kragh-Hansen, M. le Maire, J.V. Møller // Biophys J. – 1998. – Vol. 75, № 6. – P. 2932–2946.
8. Le Maire M. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents / M. Le Maire, P. Champeil, J.V. Moller // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1508. – P. 86–111.
9. Matson R.S. Use of high-performance size exclusion chromatography to determine the extent of detergent solubilization of human erythrocyte ghosts / R.S. Matson, S.C. Goheen // J Chromatogr. – 1986. – Vol. 359. – P. 285–295.
10. Pegg D. E. Principles of cryopreservation / D. E. Pegg // Meth. Mol. Biol. 2007, V. 368, P. 39–57.
11. Van Dort H.M. Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles / H.M. Van Dort, R. Moriyama, P.S. Low // J Biol Chem. – 1998. – Vol.273, № 24. – P. 14819–14826.
12. Van Dort H.M. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane / H.M. Van Dort, D.W. Knowless, J.A. Chasis, G. Lee, N. Mohandas, P.S. Low // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 50. – P. 46968–46974.