

Структурные и функциональные показатели эритроцитов кордовой и донорской крови в норме и после криоконсервирования

П.М. ЗУБОВ, О.Л. ЗУБОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Structural and Functional Indices of Cord and Donor Blood Erythrocytes in Norm and Following Cryopreservation

P.M. ZUBOV, O.L. ZUBOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Эритроциты кордовой крови (КК) отличаются рядом структурно-функциональных особенностей от эритроцитов донорской крови (ДК), которые могут влиять на устойчивость клеток к низкотемпературному воздействию. В работе проведено сравнительное изучение структурных и функциональных показателей эритроцитов КК и ДК в норме и после действия экстремальных факторов криоконсервирования.

При исследовании мембранных белков эритроцитов с помощью метода электрофореза в ПААГ установлены отличия в качественном и количественном составе основных мембранных белков эритроцитов КК и ДК. Прежде всего, это касается спектрина (его содержание в КК на 20% меньше), зоны белков полосы 7, которые на электрофореграмме в КК проявляются как структура из трех полос. Криоконсервирование эритроцитов КК и ДК с использованием непроницающего криопротектора ПЭО-1500 по методу “холодовой” обработки (ХО) показало, что распределение полос на электрофореграмме белков не изменяется. Однако после криоконсервирования эритроцитов КК, обработанных при комнатной температуре (КТ), обнаружено снижение содержания актина и белка полосы 7 по сравнению с клетками, подвергнутыми ХО, что свидетельствует о лучшей сохранности мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов. Исследование липидной асимметрии мембраны методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V – белка, который имеет высокое сродство к фосфатидилсерину и связывается с клетками, экспрессирующими его на наружной поверхности мембраны (в норме локализован только на внутренней стороне мембраны), показало, что контрольные эритроциты характеризуются низким процентом аннексин V⁺-клеток. Сравнение данного показателя у эритроцитов КК и ДК свидетельствует о более высоком проценте аннексин V⁺-клеток КК. Обработка эритроцитов ПЭО-1500 приводит к увеличению числа аннексин V⁺-клеток, однако при ХО аннексин V-меченых клеток меньше. После размораживания процент меченых клеток резко возрастает и становится фактически таким же, как у соответствующих групп до замораживания после трансфузии. Отличия в проценте аннексин V⁺-клеток в зависимости от способа обработки ПЭО-1500 также сохранялись. Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах, предварительно инкубированных в растворе ПЭО-1500 как при ХО и КТ, так и после размораживания сохраняется на уровне контрольных величин. Кроме того, по содержанию АТФ и 2,3-ДФГ эритроциты КК не отличаются от эритроцитов ДК.

Таким образом, ХО эритроцитов ПЭО-1500 перед криоконсервированием способствует сохранению структуры цитоскелета эритроцитов ДК и КК в состоянии, близком к нативному, и минимально нарушает липидную асимметрию мембраны. Эти данные коррелируют с высокой сохранностью (до 99%) эритроцитов КК и ДК, криоконсервированных по методу ХО.

Cord blood (CB) erythrocytes differ by some structural and functional peculiarities from those of donor blood (DB), which may affect cell resistance to low temperature effect. A comparative study of structural and functional indices of CB and DB erythrocytes in the norm and after the effect of cryopreservation extreme factors has been carried-out in the research.

When studying erythrocyte membrane proteins using electrophoresis method in PAAG there were established the differences in qualitative and quantitative composition of main membrane proteins of CB and DB erythrocytes. This primarily concerns spectrin (its content in CB is 20% lower), band 7 protein areas, manifesting in CB electrophoregram as three band-structures. Cryopreservation of CB and DB erythrocytes with PEO-1500 non-penetrative cryoprotectant according to the method of “cold” treatment (CT) has demonstrated a band distribution in protein electrophoregram as remaining unchanged. However after cryopreserving CB erythrocytes, treated at room temperature (RT) there was revealed a decrease in actin content and band 7 protein if to compare with the cells, subjected to CT, that testified to higher integrity of membrane-cytoskeletal erythrocyte complex. Study of lipid asymmetry in membrane with flow cytometry method using annexin V – protein, having a high affinity to phosphatidyl serine and binding with cells, expressing it at external membrane surface (it is normally located internal surface only) has demonstrated that the control erythrocytes are characterized by low percentage of annexin V⁺-cells. Comparing this index in CB and DB erythrocytes testifies to higher percentage of annexin V⁺-cells. Treating erythrocytes with PEO-1500 results in an increase in the amount of annexin V⁺-cells, however under CT there is lower amount of annexin V⁺-cells. After freeze-thawing the percentage of labeled cells sharply augments and becomes almost the same as for corresponding groups prior to freezing after transfusion. Differences in percentage of annexin V⁺-cells depending on the way of PEO-1500 treatment were kept as well. ATP and 2,3-DPG content in erythrocytes, pre-incubated in PEO-1500 solution either under CT and RT or after freeze-thawing is preserved at the level of control values. In addition, CB erythrocytes do not differ from DB ones according to ATP and 2,3-DPG content.

Thus, CT of erythrocytes with PEO-1500 prior to cryopreservation contributes to preservation of cytoskeletal structure of DB and CB erythrocytes in the state close to a native one and causes the minimum disorders in a membrane lipid asymmetry. These data correlate with a high integrity (up to 99%) of CB and DB erythrocytes, cryopreserved according to CT method.