

## Особенности распределения криопротекторов между вне- и внутриклеточной средой эритроцитов млекопитающих

В.Н. КУЧКОВ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Peculiarities of Cryoprotectant Distribution between Extra- and Intracellular Medium of Mammalian Erythrocytes

V.N. KUCHKOV

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

Распределение криозащитных веществ между эритроцитом и средой представляет собой один из показателей взаимодействия этих веществ с клеткой. В криобиологии исследование распределения криопротекторов между клеткой и средой является важным звеном при создании криозащитных сред и методов удаления криопротектора из биологической системы после цикла замораживания-отогревания.

Известно, что трансмембранные потоки вещества и распределение его между клеткой и средой не описываются простыми уравнениями диффузии и количественная оценка фракций внутри- и внеклеточного вещества в большинстве случаев может быть получена эмпирическим путем.

Цель работы – определение коэффициентов распределения диметилсульфоксида, 1,2-пропандиола и глицерина между эритроцитами млекопитающих и внеклеточной средой в условиях диффузионного равновесия и оценка влияния на эти коэффициенты фракции криопротектора, связанного с клеткой.

Коэффициенты распределения оценивали методом рефрактометрии на основании анализа показателей преломления внеклеточных растворов, полученных центрифугированием суспензий эритроцитов, содержащих криопротекторы.

Установлено, что для эритроцитов быка и лошади в области низких концентраций криопротектора (до 5% масс.) существует зависимость коэффициентов распределения от концентрации криозащитного вещества. Причиной возникновения нелинейности в данном концентрационном диапазоне является существование фракции криопротектора, адсорбированной содержимым эритроцита. По количеству фракции связанного с клеткой криопротектора исследуемые вещества можно расположить в ряд: ДМСО, глицерин и 1,2-пропандиол, в котором концентрация адсорбированного криопротектора увеличивается.

Экспериментально показано, что многократным (до 7 раз) отмыванием клеток отмывочными растворами невозможно удалить фракцию связанного с клетками криопротектора. Данный факт следует учитывать при оценке токсичности криозащитных веществ и дальнейшем использовании криоконсервированных эритроцитов в медицинской практике.

The distribution of cryoprotective substances between erythrocyte and medium is one of the indices of interaction of these substances with a cell. In cryobiology the investigation of cryoprotectant distribution between cell and medium is an essential link when developing the cryoprotective media and methods of cryoprotectant removal out of biological system after freeze-thawing cycle.

It is known that the transmembrane flows of the substance and its distribution between cell and medium are not described with simple diffusion equations and quantitative assessment of intra- and extracellular substance fractions may be obtained empirically in most cases.

The aim of work was the determination of distribution coefficients of dimethyl sulfoxide, 1,2-propane diol and glycerol between mammalian erythrocytes and extracellular medium in the conditions of diffusion balance as well as estimation of influence on these coefficients of cell-bound cryoprotectant fraction.

The distribution coefficients were assessed by refractometry method on the base of analysis of extracellular solution refraction indices obtained by centrifugation of erythrocyte suspension containing cryoprotectants.

It was established that the dependence of distribution coefficients on cryoprotective substance concentration occurs for bovine and equine erythrocytes in the range of low cryoprotectant concentrations (up to 5% w/w). Non-linearity appeared in given concentration range is caused by the occurrence of cryoprotectant fraction adsorbed by erythrocyte contents. According to the amount of cell-bound cryoprotectant fraction the investigated substances form the following row: DMSO, glycerol and 1,2-propanediol wherein a concentration of adsorbed cryoprotectant increases.

It was experimentally shown that it was impossible to remove the fraction of cell-bound cryoprotectant by multiple (up to 7 times) cell washing with washing solutions. This fact should be taken into account during evaluation of cryoprotective substance toxicity and further application of cryopreserved erythrocytes in clinics.