

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.084>

УДК 57.043:615.21/.26:547.426.1:612.111

Е.А. Чабаненко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: chabanenkoolena@gmail.com

Реакция эритроцитов на изменение температурно-осмотических условий среды в присутствии глицерина

Представлено академиком НАН Украины А.Н. Гольцевым

Показано, что присутствие глицерина на разных этапах постгипертонического шока вносит дополнительный вклад в развитие гемолиза эритроцитов; основные изменения в уровне постгипертонического лизиса происходят в диапазоне температур от 5 до 30 °С. Установлено, что при увеличении концентрации NaCl в среде регидратации значительно уменьшается повреждение эритроцитов человека.

Ключевые слова: эритроциты, постгипертонический шок, глицерин, постгипертонический лизис.

Актуальной задачей криобиологии является разработка новых подходов к решению проблемы длительного хранения клеток в условиях замораживания. Метод низкотемпературного хранения эритроцитов позволяет создавать резервные запасы крови, которые могут обеспечить готовность к чрезвычайным ситуациям, накопить аутологичные клетки, а также имеет целый ряд других трансфузиологических преимуществ [1, 2]. В разработанном методе криоконсервирования эритроцитов для предотвращения повреждения клеток при замораживании используют проникающий криопротектор — глицерин, который необходимо удалять из размороженных эритроцитов перед трансфузией [3–6].

Изучение влияния на клетки факторов криоповреждения, связанных с размораживанием и удалением проникающих криопротекторов, проводят в условиях модельных экспериментов [7, 8]. В частности, модель постгипертонического шока (ПГШ) используют для изучения влияния факторов криоповреждения на эритроциты, которые действуют на этапе их размораживания, а также при перенесении в кровеносное русло клеток, криоконсервированных под защитой проникающего криопротектора [8]. Модель ПГШ представляет собой последовательное перенесение эритроцитов из гипертонической среды (среда дегидратации) в изотоническую среду (среда регидратации) при положительных температурах. Так как в процессе размораживания биологического объекта изменяющиеся концентрации соли и глицерина действуют на клетки одновременно, целесообразно применять модельный

© Е.А. Чабаненко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова, 2019

подход для изучения влияния температуры и глицерина на постгипертонический лизис (ПГЛ) эритроцитов.

Цель исследования — изучить влияние глицерина, температуры и среды регидратации на чувствительность эритроцитов человека к действию ПГШ.

Материалы и методы. Для исследования использовали эритроциты, которые выделяли из донорской крови человека по стандартной методике. После удаления плазмы эритроциты трижды центрифугировали при 3000 об/мин (центрифуга “ОПн-ЗУ4.2”, Кыргызстан) в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl; 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при 0 °С. Все используемые среды готовили на фосфатном буфере (0,01 моль/л, pH 7,4). В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации “хч” и “чда”. ПГШ осуществляли перенесением эритроцитов из гипертонических условий (среда дегидратации; 1,5 моль/л NaCl) в физиологический раствор (среда регидратации; 0,15 моль/л NaCl) при варьировании температуры (от 0 до 37° С). Для исследования влияния глицерина и температуры на эритроциты человека в условиях ПГШ эксперимент проводили в двух вариантах. В первом варианте эритроциты, предварительно обработанные глицерином 1 : 1 (37 °С, 20 мин), подвергали действию ПГШ (контроль). Во втором варианте клетки, обработанные глицерином, также подвергали действию ПГШ, однако в среде дегидратации (1,5 моль/л NaCl) присутствовал глицерин. Для исследования влияния осмоляльности на клетки в условиях ПГШ манипуляции с эритроцитами проводили аналогично предыдущей серии экспериментов, однако на этапе регидратации варьировали концентрацию NaCl в диапазоне от 0,15 до 0,6 моль/л. Конечный гематокрит составлял 0,4 %. Уровень гемолиза эритроцитов в супернатанте определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм. За 100 % принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон X-100 (“Merck”, Германия) в концентрации 0,1 %. Статистическую обработку полученных экспериментальных результатов проводили с помощью программы “Statistica 6.0” (“StatSoft Inc., США), используя критерий Манна—Уитни.

Результаты и их обсуждение. В процессе размораживания эритроцитов повреждающее действие на клетки оказывает резкое изменение температуры и осмоляльности среды. Сочетание влияния этих факторов на клетки моделировали перенесением эритроцитов, насыщенных глицерином, из гипертонических условий в изотоническую среду при температурах от 0 до 37 °С.

Из представленных результатов (рис.1, зависимость 1) видно, что при повышении температуры в диапазоне от 5 до 25 °С уровень гемолиза эритроцитов практически не изменяется и находится в пределах 10 %. При дальнейшем повышении температуры уровень ПГЛ возрастает и при 37 °С составляет порядка 35 %. Для клеток, предварительно обработанных глицерином (зависимость 2), характерны следующие особенности. При низких температурах (0—5 °С) значения гемолитического повреждения клеток превышают аналогичные показатели для необработанных глицерином эритроцитов приблизительно в 3,5 раза. В диапазоне температур от 5 до 30 °С наблюдается равномерное снижение уровня гемолиза эритроцитов от 90 до 25 %. Таким образом, при изменении температуры на каждые 5 °С происходит падение данного показателя примерно в 1,35 раза. Следует отметить, что значе-

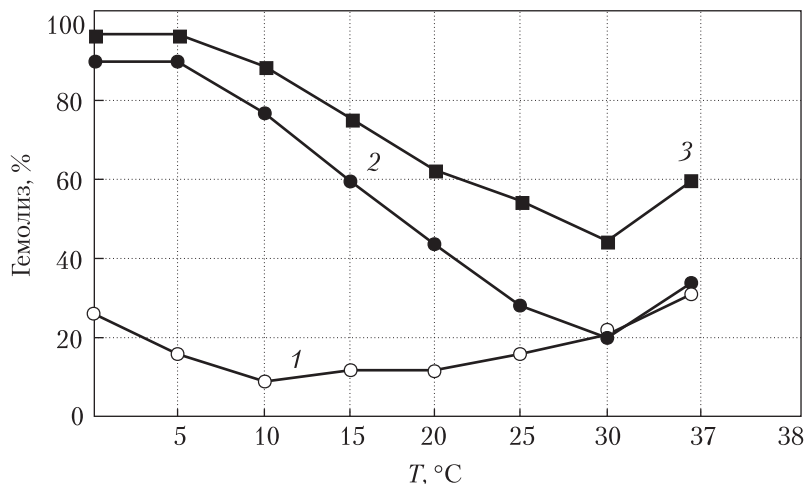


Рис. 1. Температурная зависимость постгипертонического гемолиза эритроцитов: без глицерина (1); в присутствии глицерина (15 %) на этапе предобработки клеток (2), на этапе предобработки и в среде дегидратации (3)

ния гемолитического повреждения клеток, не обработанных и обработанных глицерином, практически совпадают в зоне температур 30–37 °С.

Дополнительное введение глицерина в среду дегидратации (см. рис.1, зависимость 3) не изменяет характер температурной зависимости постгипертонического гемолиза эритроцитов, предварительно обработанных криопротектором (зависимость 2). Однако в случае присутствия глицерина в среде дегидратации уровень повреждения выше, особенно при температурах в диапазоне от 15 до 37 °С. Следует отметить, что при использовании глицерина снижение гемолиза эритроцитов более выражено при высоких температурах (15–37 °С), это обусловлено особенностями температурной зависимости проницаемости эритроцитарных мембран [9].

При перенесении клеток в среду дегидратации внутриклеточная вода выходит из эритроцитов, в результате чего они сжимаются и, как следствие, плазматическая мембрана деформируется по типу изгиба (образуются “спикулы и вмятины”). На этом этапе в эритроциты могут проникать внеклеточные ионы, поэтому при последующем переносе клеток в среду регидратации в них войдет больше воды, чем было удалено на стадии дегидратации, при этом будет происходить набухание клеток, в результате чего происходит растяжение их плазматических мембран до механического разрушения [10]. При использовании глицерина суммарное содержание внутриклеточных веществ становится выше за счет входа внеклеточного глицерина. Поэтому на этапе регидратации в эритроциты должно войти больше воды по сравнению с контрольными клетками (без глицерина), в результате чего значительное количество клеток достигает критического гемолитического объема, что и проявляется в более высоком уровне ПГЛ (см. рис. 1).

Размораживание криоконсервированных клеток под защитой проникающего криопротектора неразрывно связано с последующим удалением его молекул из клеток. Для этого используют гипертонические солевые растворы, уменьшающиеся по концентрации вплоть до физиологического значения [4, 5]. Чтобы оценить вклад глицерина, как одного из факторов повреждения, действующего на этапе отмывки, эритроциты, насыщенные глицерином, подвергали действию ПГШ (рис. 2). Концентрацию NaCl в среде регидратации варьировали от 0,15 до 0,6 моль/л.

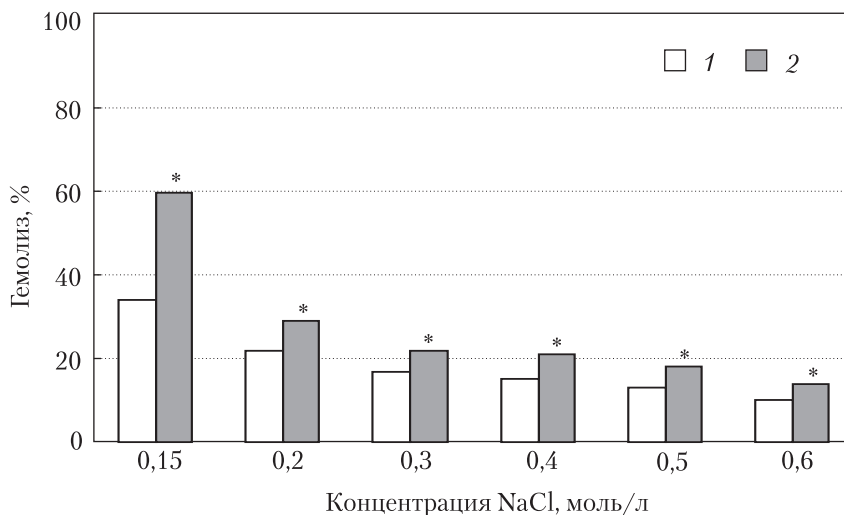


Рис. 2. Влияние глицерина (15 %) на уровень постгипертонического гемолиза эритроцитов при варьировании концентрации NaCl в среде регидратации: 1 – глицерин на этапе предобработки клеток (контроль); 2 – глицерин на этапе предобработки и в среде дегидратации. * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Количество наблюдений в каждой группе – 5

Из рис. 2 видно, что с повышением концентрации NaCl в среде регидратации уровень ПГЛ постепенно снижается как для контрольных эритроцитов (1), так и для клеток, проинкубированных в среде дегидратации, содержащей глицерин (2). Это указывает на то, что при увеличении концентрации соли в среде регидратации уменьшается риск осмотического шока клеток из-за уменьшения осмотического градиента на мембране. Присутствие глицерина в среде дегидратации приводит к дополнительному гемолитическому повреждению эритроцитов, особенно при их перенесении в физиологический раствор.

Таким образом, установлено, что присутствие глицерина на разных этапах эксперимента вносит дополнительный вклад в развитие постгипертонического гемолиза эритроцитов. На основании результатов исследования влияния температуры и глицерина можно сделать вывод, что основные изменения происходят в диапазоне температур от 5 до 30 °C. Это свидетельствует о температурозависимом изменении состояния эритроцитарной мембраны, что, в свою очередь, может оказывать влияние на ее проницаемость для молекул глицерина. Варьирование осмоляльности среды на этапе регидратации показало, что по мере увеличения концентрации NaCl уровень ПГЛ эритроцитов человека значительно уменьшается.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Acker J. P., Marks D. C., Sheffield W. P. Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. *J. Blood Transfus.* 2016. **2016**. 4860284. 28 p. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/4860284>
2. Henkelman S., Lagerberg J.W., Graaff R., Rakhorst G., Oeveren W. The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties. *Transfusion.* 2010. **50**, № 11. P. 2393–2401. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02730.x>
3. Аграненко В.А., Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова Л.И. и др. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий: Метод. рекомендации. Москва: МЗ СССР, 1980. 47 с.

4. Семенова Н.В., Федорова Л.И., Виноградов В.Л., Батышев Т.В., Суханов Ю.С. Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания. *Гематология и трансфузиология*. 1986. № 10. С. 42–52.
5. Lusianti R.E., Benson J.D., Acker J.P., Higgins A.Z. Rapid removal of glycerol from frozen-thawed red blood cells. *Biotechnol. Prog.* 2013. **29**, № 3. P. 609–620. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1710>
6. Lelkens C.C., de Korte D., Lagerberg J.W. Prolonged postthaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. *Vox Sang.* 2015. **108**, № 3. P. 219–225. doi: <https://doi.org/10.1111/vox.12219>
7. Semionova E.A., Iershova N.A., Orlova N.V., Shpakova N.M. Hypotonic lysis of mammalian erythrocytes in chlorpromazine presence. *East. Eur. Sci. J.* 2016. № 2. P. 7–17 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.12851/EESJ201604C01ART01>
8. Семионова Е.А., Ершова Н.А., Ершов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих. *Пробл. криобиологии и криомедицины*. 2016. **26**, № 1. С. 73–83. doi: <https://doi.org/10.15407/cryo26.01.073>
9. Гордієнко О.І., Коваленко С.Є., Коваленко І.Ф. Механізми проникання гліцерину крізь мембрану еритроцитів людини. *Пробл. криобиологии и криомедицины*. 2012. **22**, № 4. С. 389–397.
10. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology*. 2008. **57**, № 3. P. 251–256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.09.007>

Поступило в редакцию 26.10.2018

REFERENCES

1. Acker, J. P., Marks, D. C. & Sheffield, W. P. (2016). Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. *J. Blood Transfus.*, 2016, 4860284. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/4860284>
2. Henkelman, S., Lagerberg, J. W., Graaff, R., Rakhorst, G. & Oeveren, W. (2010). The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties. *Transfusion*. 50, No. 11, pp. 2393-2401. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02730.x>
3. Agranenko, V. A., Vinograd-Finkel', F. R., Fedorova, L. I. et al. (1980). Methods of long-term frozen storage of red blood cells intended for transfusions: Methodical recommendation. Moscow: MZ SSSR (in Russian).
4. Semenova, N. V., Fedorova, L. I., Vinogradov, V. L., Bатышев, T. V. & Sukhanov, Yu. S. (1986). A comparative study of cryopreserved retrokonektado for different methods of laundering. *Gematologiya i transfuziologiya*, No. 10, pp. 42-52 (in Russian).
5. Lusianti, R. E., Benson, J. D., Acker, J. P. & Higgins, A. Z. (2013). Rapid removal of glycerol from frozen-thawed red blood cells. *Biotechnol. Prog.*, 29, No. 3, pp. 609-620. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1710>
6. Lelkens, C. C., de Korte, D. & Lagerberg, J. W. (2015). Prolonged postthaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol. *Vox Sang.*, 108, No. 3, pp. 219-225. doi: <https://doi.org/10.1111/vox.12219>
7. Semionova, E. A., Iershova, N. A., Orlova, N. V. & Shpakova, N. M. (2016). Hypotonic Lysis of Mammalian Erythrocytes in Chlorpromazine Presence. *East. Eur. Sci. J.*, No. 2, pp. 7-17 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.12851/EESJ201604C01ART01>
8. Semionova, Ye. A., Yershova, N. A., Yershov, S. S., Orlova, N. V. & Shpakova, N. M. (2016). Peculiarities of posthypertonic lysis in erythrocytes of several mammals. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 26, No. 1, pp. 73-83 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/cryo26.01.073>
9. Gordiyenko, O. I., Kovalenko, S. Ye. & Kovalenko, I. F. (2012). Mechanisms of glycerol permeability through the membrane of human erythrocytes. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 22, No. 4, pp. 389-397 (in Ukrainian).
10. Muldrew, K. (2008). The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiology*, 57, No. 3, pp. 251-256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.09.007>

Received 26.10.2018

О.О. Чабаненко, Н.В. Орлова, Н.М. Шпакова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: chabanenkoolena@gmail.com

РЕАКЦІЯ ЕРИТРОЦИТІВ НА ЗМІНУ ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧНИХ УМОВ СЕРЕДОВИЩА ЗА НАЯВНОСТІ ГЛІЦЕРИНУ

Показано, що наявність глицерину на різних етапах постгіпертонічного шоку чинить додатковий внесок у розвиток гемолізу еритроцитів; основні зміни рівня постгіпертонічного лізису відбуваються в діапазоні температур від 5 до 30 °С. Встановлено, що зі збільшенням концентрації NaCl в середовищі регідратації значно зменшується пошкодження еритроцитів людини.

Ключові слова: *еритроцити, постгіпертонічний шок, глицерин, постгіпертонічний лізис.*

O.O. Chabanenko, N.V. Orlova, N.M. Shpakova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: chabanenkoolena@gmail.com

RESPONSE OF RED BLOOD CELLS TO THE ALTERATION OF THE TEMPERATURE-OSMOTIC CONDITIONS OF A MEDIUM IN THE PRESENCE OF GLYCEROL

It has been shown that the presence of glycerol at different stages of posthypertonic shock makes an additional contribution to the development of hemolysis of red blood cells; the main changes in the level of posthypertonic lysis occur in the temperature interval from 5 to 30 °C. It has been found that, as the NaCl concentration in the rehydration medium increases, a significant decrease of the damage of human red blood cells is observed.

Keywords: *red blood cells, posthypertonic shock, glycerol, posthypertonic lysis.*