

Оценка проницаемости мембран эритроцитов с помощью осмотического шока

О.М. ДЕНИСОВА¹, Дж. М. НИЦШЕ², Л.А. ВОДОПЬЯНОВА¹, Г.Ф. ЖЕГУНОВ¹

¹Харьковская государственная ветеринарная академия

²Университет Буффало, Университет штата Нью-Йорк, Буффало

Characterization of Erythrocyte Membrane Permeability by Osmotic Shock

O.M. DENYSOVA¹, J.M. NITSCHÉ², L.A. VODOPYANOVA¹, G.F. ZHEGUNOV¹

¹Kharkov State Veterinary Academy, Kharkov, Ukraine

²University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, USA

Для проявления криозащитного эффекта молекулы криопротектора должны проникнуть внутрь клетки, поэтому количественное описание проницаемости клеточной мембраны для этих молекул давно является ключом для механистического толкования их функции. В этой работе предложено определение параметров проницаемости с использованием осмотического шока. При этом считается, что: (I) кренация происходит главным образом мгновенно после погружения эритроцитов в концентрированный раствор криопротектора, с последующим медленным проникновением криопротектора через мембрану в течение определенного периода t , а (II) гемолиз происходит при последующем переносе эритроцитов из концентрированного раствора криопротектора в солевой раствор, если t был достаточно велик, для того чтобы в клетку проникло столько криопротектора, чтобы конечный осмотически равновесный объем клетки превысил порог механической прочности мембраны.

Классические подходы опираются на отдельный эксперимент для определения «критического» порогового объема, при котором 50% эритроцитов подвергаются гемолизу. Мы вместо этого ввели вероятностное распределение для суммарного значения гемолиза (в процентах) в зависимости от объема клетки с регулируемым параметром ширины. Как коэффициент проницаемости криопротектора, так и ширина распределения определяются независимо, исходя только из процедуры подбора соответствующих данных о выраженных в процентном значении гемолиза в зависимости от времени проникновения t . Мы обнаружили, что начальная кренация, по видимому, делает эритроциты более хрупкими, а критический объем достигается меньшими значениями осмотического шока, по сравнению с определяемыми ранее. Новые данные, полученные с помощью более последовательного анализа, дают меньшие величины проницаемости по сравнению с классическими определениями вплоть до порядка величины. В докладе представлены данные экспериментов по определению проницаемости мембраны для глицерина и ДМСО на эритроцитах крупного рогатого скота и лошадей при различных температурах от 0 до 37°C. Приводятся механистические выводы путем сравнения собственных результатов с новой детальной критической оценкой свойств проницаемости, присущих бислойным мембранам.

Insofar as cryoprotectant molecules must enter erythrocytes to be effective, quantitative understanding of the permeability of the cell membrane to these molecules has long been key to the mechanistic understanding of their function. This talk describes a novel revisit of permeability determinations by osmotic shock, in which: (i) crenation occurs essentially instantaneously upon immersion of erythrocytes in a concentrated cryoprotectant solution, followed by slow membrane penetration of the cryoprotectant over a specific period t , and (ii) hemolysis occurs upon subsequent removal of the erythrocytes from the concentrated cryoprotectant solution and immersion in saline if t was long enough for so much cryoprotectants to have entered that the final osmotically equilibrated cell volume exceeds the mechanical threshold of the membrane.

Classical approaches rely on a separate experiment to determine the 'critical' threshold volume at which 50 percent of erythrocytes undergo hemolysis. We instead introduce a probability distribution for cumulative percentage hemolysis as a function of cell volume with an adjustable width parameter. Both the cryoprotectant permeability coefficient and the width of the distribution are determined in a self-contained manner from best fits to osmotic shock data alone expressed in terms of percentage hemolysis as a function of permeation time t . We find that the initial crenation apparently renders erythrocytes more fragile and makes the critical volume applicable to the actual osmotic shock experiment smaller than usually determined separately. The new, more self-consistent data analysis yields permeabilities smaller than classical determinations by up to an order of magnitude. We demonstrate our procedure with reference to glycerol and DMSO membrane permeability for bovine and equine erythrocytes at various temperatures between 0 and 37°C. Mechanistic conclusions are suggested by comparing our results with a detailed new critical assessment of the intrinsic permeability properties of bilayer membranes.