

ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА УДАЛЕНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ

М.В. Останков*, А.А. Костяев**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков**
*Кировский НИИ гематологии и переливания крови РАН, г.Вятка***

Поступила в редакцию 3 декабря 1999г.

Методом численного моделирования с использованием уравнений трансмембранного массопереноса исследована устойчивость деконсервированных клеток к постгипертоническому лизису в процессе их однократной отмывки от криопротектора. Показано, что наиболее сильное влияние на результат этой процедуры оказывают величины разведения оттаянной клеточной суспензии отмывающим раствором и концентрация не проникающего в клетки вещества в нем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: численное моделирование, криопротектор, постгипертонический криогемолиз

После оттаивания замороженной клеточной суспензии из нее, как правило, должен быть удален проникающий в клетки криопротектор. Необходимость этой процедуры обусловлена, в частности, возможным токсическим действием больших концентраций криопротектора на организм реципиента. Однако, кроме того, даже в том случае, когда количество криопротектора в оттаянной клеточной суспензии недостаточно для непосредственного токсического действия на организменном уровне, трансфузия деконсервированного биологического материала в организм реципиента может привести к повреждению клеток, попадающих в изотоническую среду, за счет постгипертонического лизиса. Последний возникает из-за того, что в процессе удаления криопротектора из деконсервированной клеточной суспензии объем клеток может увеличиваться и, если это увеличение объема достаточно велико (для эритроцита человека - примерно в 1,8 раз по сравнению с нормальным объемом), то клеточная мембрана принимает форму сферы и подвергается изотропному натяжению. Большое изотропное натяжение мембраны, в свою очередь, приводит к ее разрыву, вследствие чего клетка погибает. Обычно предполагается [1], что существует определенное критическое натяжение мембраны, при котором она разрушается, что и является причиной постгипертонического лизиса клеток. Именно по этой причине перемещение деконсервированных клеток в изотонический раствор является опасным для них.

Цель этой статьи состоит в теоретическом обосновании оптимизации процедуры однократного удаления криопротектора из деконсервированной клеточной суспензии путем перемещения оттаянных клеток в отмывающий раствор не проникающего в клетки вещества, последующего центрифугирования и удаления надосадочной жидкости.

Пусть до начала криоконсервирования клеточная суспензия имела объем $V_c(0)$, суммарный объем клеток в ней был $V_c^{in}(0)$, объем внеклеточного раствора $V_c^{out}(0) = V_c(0) - V_c^{in}(0)$ и объемная доля клеток в ней составляла H_0 , разведение клеточной суспензии криоконсервирующим раствором с концентрацией проникающего в клетки криопротектора $p_k(0)$ и не проникающего в клетки вещества $p_b(0)$ осуществлялось в Q раз. Пусть далее после замораживания-оттаивания клеточная суспензия разводилась отмывающим раствором с концентрацией не проникающего в клетки вещества $p_d(0)$ в R раз и доля неразрушившихся после замораживания - оттаивания клеток (до отмывания) составляет 100% (то есть режим замораживания - оттаивания является оптимальным). Если обозначить через $V_a(0)$ и $V_b(0)$ объемы указанных выше криоконсервирующего и отмывающего растворов соответственно, то по определению имеем:

$$\begin{aligned} V_c^{in}(0) / [V_c^{in}(0) + V_c^{out}(0)] &= H_0 \\ V_c(0) + V_a(0) &= QV_c(0) \\ V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) &= R[V_c(0) + V_a(0)] \end{aligned} \quad (1)$$

Из закона сохранения масс растворенных в системе компонентов после разведения оттаянной клеточной суспензии отмывающим раствором получаем:

$$\begin{aligned} N_c^{in} &= N_c^{in}(0), N_c^{out} = N_c^{out}(0), N_b = N_b(0) \\ N_d &= N_d(0), N_k^{in} + N_k^{out} = N_k(0) \end{aligned} \quad (2)$$

где $N_c^{in}(0)$ и $N_c^{out}(0)$ - число молей не проникающего через клеточную мембрану вещества во внутри- и внеклеточном растворах в клеточной суспензии до ее смешения с криозащитным раствором, N_c^{in} и N_c^{out} - число молей не проникающего через клеточную мембрану вещества во внутри- и внеклеточном растворах после смешения оттаянной клеточной суспензии с отмывающим раствором, $N_b(0)$ и $N_d(0)$ - число молей не проникающего в клетки вещества в криозащитном и отмывающем растворах соответственно, N_b и N_d - число молей b-го и d-го не проникающих в клетки веществ в разведенной отмывающим раствором оттаянной клеточной суспензии, N_k^{in} и N_k^{out} - число молей проникающего через клеточную мембрану криопротектора внутри и вне клеток соответственно в разведенной отмывающим раствором оттаянной клеточной суспензии, $N_k(0)$ - число молей криопротектора в криозащитном растворе.

По определению:

$$\begin{aligned} n_c^{in} &= N_c^{in} / (V^{in} - V_n) \\ n_c^{out} &= N_c^{out} / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \\ n_b &= N_b / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \\ n_d &= N_d / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \\ n_k^{in} &= N_k^{in} / (V^{in} - V_n) \\ n_k^{out} &= N_k^{out} / [V_c(0) + V_a(0) + V_b(0) - V^{in}] \end{aligned} \quad (3)$$

где V^{in} - суммарный объем клеток на стадии отмывания, V_n - суммарный объем осмотически неактивных внутриклеточных веществ в исходной клеточной суспензии, n_c^{in} и n_k^{in} - концентрации с-го вещества и криопротектора во внутриклеточном растворе на стадии отмывания оттаянной клеточной суспензии от криопротектора, n_c^{out} , n_b , n_d и n_k^{out} - концентрации с-го, b-го, d-го вещества и криопротектора во внеклеточной среде на стадии отмывания оттаянной клеточной суспензии от криопротектора.

Комбинируя (1) - (3), находим:

1) для внутриклеточной концентрации не проникающего через клеточную мембрану вещества

$$n_c^{in} = n_c^{in}(0) (1 - \alpha) / (y - \alpha) \quad (4)$$

2) для внеклеточной концентрации не проникающего через клеточную мембрану вещества, растворенного в подлежащей криоконсервированию клеточной суспензии до ее разведения криоконсервирующим раствором

$$n_c^{out} = n_c^{in}(0) (1 - H_0) / [QR - H_0 y] \quad (5)$$

(здесь принято во внимание, что $n_c^{in}(0) = n_c^{out}(0)$);

3) для внеклеточной концентрации b-го не проникающего через клеточную мембрану вещества

$$n_b^{out} = n_b(0) (Q - 1) / [QR - H_0 y] \quad (6)$$

4) для внеклеточной концентрации d-го не проникающего через клеточную мембрану вещества

$$n_d^{out} = n_d^{out}(0) Q (R - 1) / [QR - H_0 y] \quad (7)$$

5) для внеклеточной концентрации проникающего через клеточную мембрану криопротектора

$$n_k^{out} = [n_k(0) (Q - 1) - H_0 n_k^{in} (y - \alpha)] / [QR - H_0 y] \quad (8)$$

где α - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ, $y = V^{in} / V^{in}(0)$ - относительный объем клеток.

Трансмембранный перенос воды и криопротектора описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений Кедем-Качальского в модификации [2]:

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{d}{dt} \frac{V_c^{in}}{V_c^{in}(0)} &= SL_p rT [\sigma_k (n_k^{in} - n_k^{out}) + \\
 &+ n_c^{in}(0) \frac{1-\alpha}{V_c^{in}/V_c^{in}(0) - \alpha} - n_c^{in}(0) \frac{1-H_0}{QR-H_0y} - \\
 &- n_b(0) \frac{Q-1}{QR-H_0y} - n_d(0) \frac{Q(R-1)}{QR-H_0y}] \quad (9) \\
 \frac{dn_k^{in}}{dt} &= - \frac{SP/V_0}{V_c^{in}/V_c^{in}(0) - \alpha} \{ [n_k^{in} - n_k^{out}] + \sigma_k n_k^{in} \frac{dV_c^{in}}{dt V_c^{in}(0)} \}
 \end{aligned} \right\}$$

где t - время, S и L_p - площадь поверхности и коэффициент фильтрации клеточной мембраны, σ_k - коэффициент отражения клеточной мембраны для молекул криопротектора, R - коэффициент проницаемости клеточной мембраны для криопротектора, γ - универсальная газовая постоянная, T - абсолютная температура, V_0 - объем консервируемой клетки в физиологической среде.

Поскольку характерное время проникновения молекул воды через мембраны эритроцитов $\tau_0 = V_0 / SL_p rT$ составляет только 10 микросекунд, а характерное время проникновения молекул криопротектора через клеточную мембрану $\tau_1 = V_0 / SP$ во всяком случае превышает десятки секунд, то трансмембранный перенос веществ с очень большой точностью можно описывать следующей системой уравнений, которая вытекает из (9) с учетом (4) - (8) при $\tau_0 \rightarrow 0$:

$$\left. \begin{aligned}
 y - \alpha &= \frac{(1 - \alpha) (QR - H_0 \alpha)}{n_k(0) (Q-1) + 1 - \alpha H_0 + n_b(0) (Q-1) + n_d(0) Q(R-1) - (QR - H_0 \alpha) n_k^{in}} \quad (10) \\
 \frac{d}{dt} n_k^{in} &= - \frac{1}{y - \alpha} \left[n_k^{in} - \frac{n_k(0) (Q-1) - H_0 n_k^{in} (y - \alpha)}{QR - H_0 \alpha - H_0 (y - \alpha)} \right]
 \end{aligned} \right\}$$

Исходя из (10), можно получить временные зависимости относительного объема клеток и внутриклеточной концентрации криопротектора на стадии отмывания оттаянной клеточной суспензии от криопротектора в зависимости от параметров $n_d(0)$, n_k^{in} , Q , R , $n_b(0)$, H_0 , $n_k(0)$. Эти расчетные зависимости представлены на рис. 1-4. Анализ представленных на них результатов численного моделирования однократной отмывки оттаянной клеточной суспензии от криопротектора показывает, что этот процесс протекает более оптимально (то есть быстрее и без нарушения целостности мембран за счет их изотропного натяжения), когда разность между концентрацией криопротектора в криозащитной среде и концентрацией криопротектора внутри размороженных клеток имеет меньшее значение, то есть после более быстрых режимов охлаждения-отогрева. Результат отмывания клеточной суспензии от криопротектора улучшается и с увеличением количества отмывающего раствора, то есть R , при фиксированных значениях прочих параметров. Улучшение режима отмывки, хотя и незначительное, имеет место при увеличении концентрации клеток в консервируемой клеточной суспензии H_0 и концентрации не проникающего в клетки вещества в криозащитной среде $n_b(0)$. Наиболее сильное влияние на эффективность процесса отмывки наряду с параметром R оказывает концентрация не проникающего в клетки компонента отмывающего раствора $n_d(0)$. С увеличением этого параметра процесс удаления криопротектора из размороженных клеток протекает более оптимально, чем при более низких значениях этого параметра. Учитывая то обстоятельство, что значения большинства фигурирующих в построенной модели параметров при изменении их в разумных пределах слабо влияют на процесс отмывки, либо не могут задаваться произвольно, так как только их определенные значения обеспечивают необходимую эффективность при замораживании - оттаивании, можно утверждать, что

оптимизация процесса однократной отмывки клеток от криопротектора состоит в подборе оптимальных значений только двух параметров отмывающего раствора R и $n_d(0)$, то есть количества отмывающего раствора и концентрации в нем не проникающего в клетки вещества. Последнее, очевидно, должно иметь высокую осмотическую активность, то есть иметь как можно более низкую молекулярную массу при сохранении непроницаемости через мембраны консервируемых клеток и быть нетоксичным на клеточном уровне при как можно более высоких концентрациях. Возможная токсичность не проникающего через клеточные мембраны компонента отмывающей среды, по существу, является единственным серьезным ограничением для эффективного применения однократной отмывки размороженных клеток.

Как видно из представленных результатов, процесс однократной отмывки практически полностью завершается за время порядка $0,5 (SP / V_0)^{-1}$. По истечении указанного промежутка времени избыток отмывающей среды должен быть удален путем осаждения клеток осторожным центрифугированием и удаления надосадочной жидкости. Очевидно, последующее перемещение отмывтых таким образом клеток в изотоническую среду не повлечет за собой их повреждения путем постгипертонического лизиса.

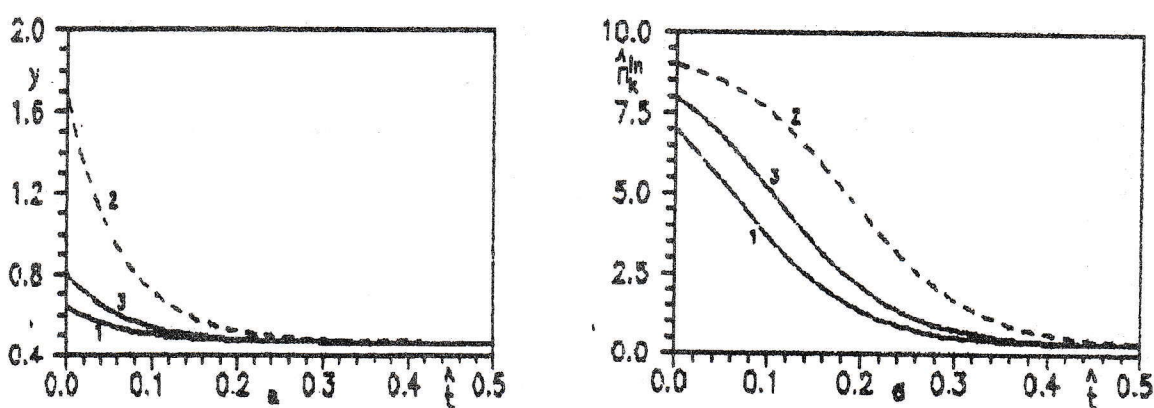


Рис. 1 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации криопротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра

$$n_k^{in};$$

1 - 7; 2 - 9; 3 - 8.

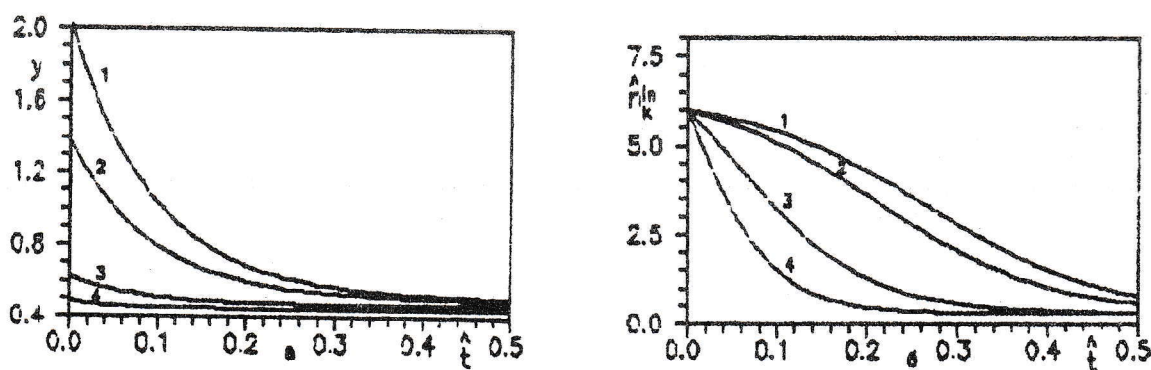


Рис. 2 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации криопротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра $n_d(0)$:

$$n_k^{in} = 6; \quad 1 - 7,2; 2 - 7,5; 3 - 10; 4 - 15.$$

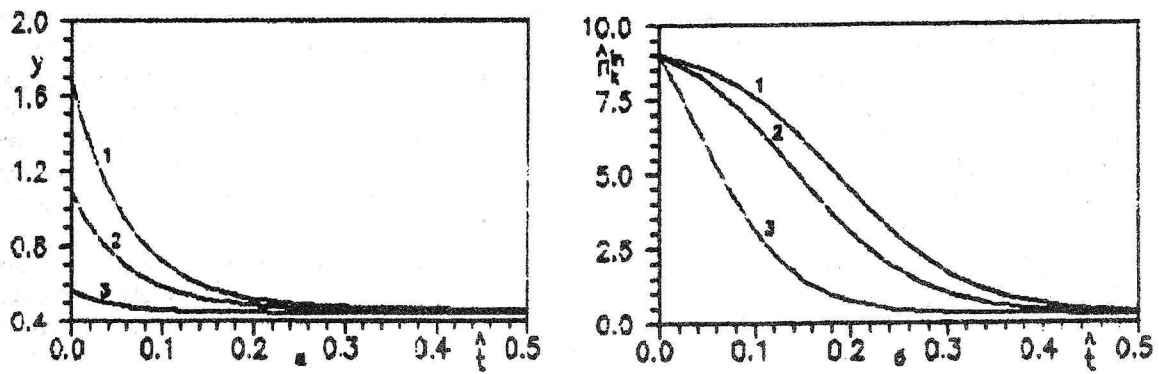


Рис. 3 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации крипротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра $n_d(0)$:

$$n_k^m = 9; \quad 1 - 11; 2 - 12; 3 - 15.$$

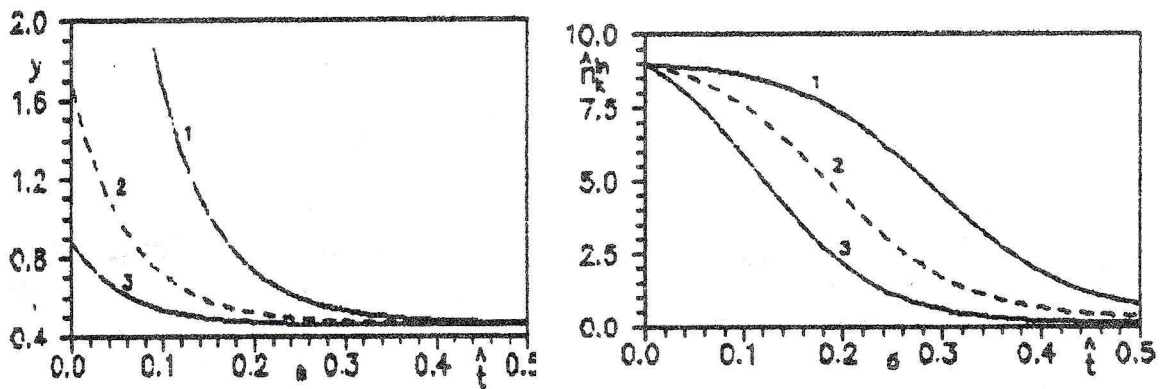


Рис. 4 Зависимость относительного объема (а) отмываемых клеток и приведенной внутриклеточной концентрации крипротектора (б) от безразмерного времени при различных значениях параметра R :
1 - 4; 2 - 5; 3 - 10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evans E.A., Leblond P.F. Geometric properties of individual red blood cell discocyte-spherocyte transformations// *Biorheology*.-1973.-V.10.-P.393-404.
2. Гордиенко Е.А., Пушкаръ Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий/К.:Наук.думка, 1994.-143с.