

## Модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса при криоконсервировании эритроцитов человека в присутствии глицерола

UDC 57.043:612.111:547.42

O.A. KOFANOVA, N.G. ZEMLYANSKIKH\*

## Modifications of Membrane-Cytoskeleton Proteins on the Human Erythrocyte Cryopreservation in the Glycerol Presence

Изучены модификации мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов, экспонированных в растворе глицерола и криоконсервированных под его защитой, в средах различной ионной силы. Установлено, что глицерол оказывает слабое влияние на структуру мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов, а различия в белковом спектре размороженных деглицеринизированных эритроцитов и нативных клеток также незначительны.

**Ключевые слова:** эритроцит, цитоскелет, мембрана, глицерол, криоконсервирование.

Вивчені модифікації мембрано-цитоскелетного комплексу еритроцитів, експонованих в розчині гліцеролу та криоконсервованих під його захистом, у середовищах різної іонної сили. Встановлено, що гліцерол має слабкий вплив на структуру мембрано-цитоскелетного комплексу еритроцитів, а відмінності у білковому спектрі разморожених дегліцеринізованих еритроцитів і нативних клітин також незначні.

**Ключові слова:** еритроцит, цитоскелет, мембрана, гліцерол, криоконсервування.

The purpose of the work was the investigation of membrane-cytoskeleton complex modification in erythrocytes exposed in glycerol solution and cryopreserved under its protection in media with different ionic strength. It was shown that glycerol influenced weakly to erythrocyte membrane-cytoskeleton complex structure and the differences in protein spectra of thawed deglycerolized erythrocytes and native ones were not pronounced also.

**Key-words:** erythrocyte, membrane, cytoskeleton, glycerol, cryopreservation.

Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой глицерола широко используется в практике криобанков [6]. Изучение изменений белок-белковых взаимодействий (ББВ) в мембрано-цитоскелетном комплексе (МЦК), индуцированных глицеролом и низкими температурами, дает возможность более детально исследовать механизмы стабилизации клеток при действии стрессовых факторов на примере наиболее успешного метода криоконсервирования. Модификация структурного состояния может сопровождаться изменением сродства взаимодействия между отдельными белками, при этом повышение аффинности в одних комплексах и ослабление белковых контактов между другими макромолекулами, очевидно, происходят независимо друг от друга. Результатом такой модификации может быть особое состояние структуры МЦК, повышающее устойчивость клеток к действию стрессовых факторов при криоконсервировании.

Цель работы – изучение модификации белкового состава МЦК эритроцитов, экспонированных в

растворе глицерола и криоконсервированных под его защитой, в средах различной ионной силы и варьирующим содержанием двухвалентных катионов.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили эритроциты доноров, которые отмывали в 3-4 этапа раствором 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,4. Для замораживания использовали состав криоконсерванта, включающего 30% глицерола, 4% маннитола, 0,7% NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,4. Образцы замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$  быстрым погружением контейнеров в жидкий азот, оттаивали при  $42-44^{\circ}\text{C}$  в водяной бане. Для отмывки клеток от глицерола применяли растворы с понижающейся концентрацией NaCl [5]. Для получения теней аликвоты эритроцитов лизировали в 20 объемах сред В, С, D содержащих 135, 250 и 500 мМ KCl соответственно. Каждая среда была дополнена добавками двух типов:  $1-10^{-5}$  М  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-3}$  М  $\text{MgCl}_2$ ;  $2-2$  мМ ЭДТА. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду и 0,02% сапонина. На этапе

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373  
3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

лизиса (30 мин при 0–4°C) все растворы содержали ингибитор протеаз PMSF (1 мг/мл) и дитиотреитол (10 мМ). Тени эритроцитов трижды отмывали двадцатикратными объемами соответствующих растворов. Аликвоты теней солибилизировали в sample буфере [2]. Электрофорез белков теней эритроцитов проводили в вертикальных пластинах SDS-ПААГ в системе Laemmly [2]. Для денситометрирования и анализа гелей применяли программное обеспечение GEL (Великобритания), статистического анализа — программный пакет Statgraphics for Win 2.0. Для оценки достоверности различий в выборках использовали параметр „критерий знаков”.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что состав белков теней эритроцитов, экспонированных в глицеролсодержащем растворе, не отличается от белкового спектра нативных контрольных клеток в растворах с физиологической и умеренно высокой ионной силой (135, 250 мМ). При этом включение в экстрагирующие среды двухвалентных катионов или их полное хелатирование в присутствии ЭДТА не оказывало видимого эффекта на идентификацию различий в составе белков МЦК двух сравниваемых групп. Очевидно насыщение клеток глицеролом значительно не влияет на характер взаимодействия между различными белковыми компонентами МЦК. Однако полученные результаты не позволяют однозначно утверждать, что глицерол не вызывает изменений в конформации белков МЦК. Очевидно, глицерол оказывает слабое модифицирующее влияние на структуру МЦК без “патологических” отклонений.

При повышении ионной силы раствора до 500 мМ KCl установлено, что эритроциты, инкубированные в глицеролсодержащей среде, отличаются от нативных клеток повышением относительного содержания спектрина и белка полосы 3 в присутствии ЭДТА.

Таким образом, перестройки белок-белковых взаимодействий (ББВ) МЦК эритроцитов под влиянием глицерола слабо выражены в растворах с высокой ионной силой и практически не зависят от содержания двухвалентных катионов. Незначительные изменения в реагировании белков МЦК эритроцитов, инкубированных с глицеролом, по сравнению с нативными клетками, на физико-химические параметры окружающего раствора выявляются только при увеличении концентрации соли до 500 мМ KCl и хелатировании двухвалентных катионов 2 мМ ЭДТА.

Действие низких температур на клеточные суспензии сопряжено с модификацией физико-химических параметров среды [4]. Белковый состав МЦК в эритроцитах, криоконсервированных под

защитой глицерола, непосредственно после их размораживания, т.е. без отмывания от криопротектора, в зоне физиологических значений ионной силы или при умеренном превышении нормы данного показателя характеризуется увеличением относительного содержания белков полос 4.1 и 4.2. Кроме того, в данных условиях отмечено повышение относительного содержания белка полосы 3 по сравнению с контрольными нативными клетками. Можно предположить, что после замораживания-отогрева клеток такие изменения белков, участвующих в формировании вертикальных контактов цитоскелета с компонентами плазматической мембраны за счет взаимодействия с белком полосы 3 или в составе надмолекулярных комплексов с участием гликофоринов [1], связаны с формированием особого состояния структуры, позволяющей контролировать свойства мембраны и компенсировать возможные негативные изменения в других зонах МЦК.

Важно отметить, что на данном этапе размороженная суспензия клеток содержит как стабильные эритроциты, так и дестабилизированные клетки, которые подвергаются лизису на последующих этапах серийных отмывок в процессе удаления глицерола. Поэтому выявленные в средах высокой ионной силы изменения белкового состава МЦК могут отражать модификации ББВ в обеих субпопуляциях эритроцитов, отличающихся структурной устойчивостью.

При физиологических значениях ионной силы в отмытых от криопротектора криоконсервированных эритроцитах в присутствии двухвалентных катионов отмечается повышение относительного содержания анкирина и белка полосы 4.1, а в растворе с высокой концентрацией соли (500 мМ KCl) регистрируется некоторое снижение анкирина.

Несмотря на то, что отдельные белки в МЦК деглицеринизированных эритроцитов и нативных клеток имеют некоторые отличия, функциональные характеристики криоконсервированных эритроцитов после деглицеринизации, как свидетельствуют результаты их клинического применения при трансфузии пациентам, вполне удовлетворительные. Некоторые отклонения в структурно-функциональном состоянии МЦК, по-видимому, не являются серьезными структурными нарушениями, поскольку клетки вполне стабильны [3] и могут адекватно поддерживать деформируемость, фильтруемость и механическую стабильность.

### Выводы

1. Глицеролсодержащая среда оказывает слабое влияние на структуру МЦК эритроцитов
2. Изменения состава белков в МЦК криоконсервированных эритроцитов после деглицери-

низации, по-видимому, не оказывают существенного влияния на структурную стабильность клеток.

### Литература

1. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M.L. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // *Blood*.– 2003.– Vol. 101, N10.– P. 4180–4188.
2. Fairbanks G., Steek T.L., Wallach D.F.H. Electrolytic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane // *Biochem.*– 1971.– Vol.10.– P. 2606–2617.
3. Lelkens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method // *Transfusion*.– 2003.– Vol.43.– P. 157–164.
4. Meryman H.T., Williams R.J., Douglas M. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection // *Cryobiology*.– 1977.– Vol.14.– P. 287–302.
5. Rowe A.W., Eyster E., Kellner A. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion: A low glycerol-rapid freeze procedure // *Cryobiology*.– 1968.– Vol. 5.– P. 119–128.
6. Valeri C.R., Ragno G., Pivacek L.E. et al. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at –80 degrees C for up to 37 years // *Vox. Sang.*– 2000.– Vol. 79.– P. 168–174.

Поступила 1.07.2008