DOI 10.31718/2077-1096.21.1.101
УДК 57.043: 612.111: 576.31

Рамазанов В.В., Семенченко А.Ю., Руденко С.В.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ МОРФОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

При трансфузии эритроцитов значительная часть клеток (~25%) в течение суток утилизируется селезенкой и печенью из-за нарушения деформируемости и повреждения клеточных мембран, получаемых при гипотермическом хранении или криоконсервировании. Повышение свободного железа в крови при разрушении эритроцитов ведет к стимуляции окислительного стресса и воспаления, а также к нарушению функций основных органов. Первичным показателем повреждений мембран эритроцитов может служить их морфология. В работе исследовали морфологические характеристики эритроцитов после криоконсервирования в среде, содержащей ПЭГ-1500 и 1,2-ПД. Эритроциты, отмытые после оттаивания и суспендированные в изотоническом растворе NaCl, представлены эхиноцитами, в тоже время, при переносе в раствор с альбумином отмечается нормализация дискоидной формы клеток. Согласно устоявшейся концепции, регуляция формы эритроцитов определяется изменением конформации анионного переносчика, который сформирован основным интегральным белком мембран – белком полосы 3. Показано, что обработка эритроцитов ДИДС, которая приводит к фиксации конформации переносчика с транспортным сайтом, обращенным на внешнюю сторону мембраны, не изменяет морфомодулирующего действия альбумина. Вместе с тем, при снижении pH среды, когда заряд альбумина приближается к нулю, его действие устраняется. Полученные результаты позволяют предположить, что при замораживании-оттаивании эритроцитов нарушение гидрофобных взаимодействий трансмембранных сегментов белка полосы 3 сопровождается изменением баланса электростатических взаимодействий. Вероятно, действие альбумина осуществляется за счет установления и стабилизации указанного баланса мембран, характерного для дискоидной формы эритроцитов. Восстановление морфологии криоконсервированных эритроцитов перед трансфузией может способствовать улучшению деформируемости клеток, улучшению системной гемодинамики и предупреждению развития негативных клинических последствий.

Ключевые слова: эритроциты, криоконсервирование, морфология.

Данная работа является фрагментом темы № 121, № гос. регистрации 0119U100441.

Введение

При гипотермическом хранении (ГТХ) эритроцитов отмечается изменение их гемореологических характеристик (деформируемость, агрегируемость, адгезивность), которые при трансфузии являются причиной нарушения микроциркуляции, системной гемодинамики и развития сосудистой дисфункции [1, 2]. Деформируемость эритроцитов определяется дискоидной формой клеток, при этом сфероциты и сфероэхиноциты обладают низкой способностью к деформации [3]. Развитие эхиноцитоза эритроцитов при ГТХ является обратимым, так как отмывание ГТХ-эритроцитов средой с альбумином обеспечивает восстановление дискоидной формы и улучшает их гемореологические свойства [1]. Кроме того, эритроциты, отмытые после замораживания в комбинированной среде с ПЭГ-1500 и 1,2-ПД, морфологически представлены эхиноцитами. В изотоническом растворе, содержащем альбумин, клетки становятся дискоцитами с невысоким содержанием эхиноцитов [4]. Вместе с тем, механизм стабилизации альбумином дискоидной формы эритроцитов остается невыясненным [5, 1]. Альбумин представляет собой глобулярный белок, в центре которого расположены гидрофобные радикалы, а внешняя часть состоит из гидрофильных остатков аминокислот. Отрицательный заряд альбумина определяется превышением числа кислых аминокислотных остатков над основными, что приводит к примерно 15-ти отрицательным зарядам на молекулу при pH 7.0 [6]. Данное обстоятельство не исключает как гидрофобные, так и электростатические эффекты воздействия альбумина на форму эритроцитов.

Нарушение биомеханических свойств эритроцитов связано с изменением отношения площади поверхности к объему эритроцитов из-за везикуляции, или с уменьшением поверхностного заряда вследствие фрагментации сиаловых кислот гликопротеинов [7, 8]. При замораживании эритроцитов в криоконсерванте с глицерином везикуляция не выявляется [9], но отмечается снижение поверхностного заряда, как и при замораживании в среде с 1,2-ПД [10]. При замораживании эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 изменение поверхностного заряда не отмечается [10]. Вместе с тем, в криоконсерванте, содержащем ПЭГ-1500, отмечается нарушение механизма асимметричного трансмембранного распределения фосфатидилсерина (ФС) [11]. Поступление ФС на внешнюю поверхность липидного бислоя может привести к взаимодействию ФС с положительно заряженными остатками аргинина и лизина интегрального белка полосы 3, что может вызвать нарушение электростатического баланса мембран [12]. Кроме того, в среде с

ПЭГ-1500 выявляется ослабление гидрофобных взаимодействий на поверхности мембран эритроцитов [13], а также интенсификация образования активных форм кислорода [14]. Представленные данные литературы указывают на негативные эффекты основных криопротекторов, которые используются при криоконсервировании эритроцитов. Возможно, вклад в нарушение структуры мембран и морфологии эритроцитов при криоконсервировании может определяться ослаблением гидрофобных взаимодействий в среде с ПЭГ-1500 перед замораживанием. Кроме того, снижение заряда эритроцитов при замораживании в среде с глицерином или 1,2-ПД указывает на изменение баланса электростатических взаимодействий, которое сопровождает развитие структурных нарушений клеточных мембран в ходе замораживания-оттаивания.

Цель работы – исследовать изменение формы криоконсервированных и модифицированных эритроцитов при воздействии альбумина.

Объект и методы исследования

В работе использовали полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) производства «Merck» (Германия) и 1,2-пропандиол (1,2-ПД) производства «Химпром» (Россия). Среда криоконсервирования содержала ПЭГ-1500 (20%), 1,2-ПД (15%) и NaCl (0,65%). Эритроциты получали из крови 2-й группы после трехкратного отмывания изотоническим раствором NaCl. Металлические контейнеры объемом 10 мл с образцами эритроцитов в криоконсерванте с гематокритом 40% инкубировали 20 мин при 22°С, затем погружали в жидкий азот (–196°С) и хранили в течение 3-х лет. Образцы эритроцитов размораживали на водяной бане при 40°С в течение 3 мин, затем к 1 мл размороженной клеточной суспензии при перемешивании медленно добавляли 9 мл теплого (37°С) изотонического раствора NaCl в течение не менее 30 секунд (скорость добавления – не более 0,3 мл/сек). Суспензию центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Процедуру разведения и центрифугирования повторяли еще один раз, после этого эритроциты отмывали теплым (37°С) изотоническим раствором NaCl, при этом скорость разведения осадка эритроцитов не учитывалась.

Для структурной модификации интегрального белка полосы 3 взвесь эритроцитов инкубировали в течение 1 ч при 37°С в среде, содержащей 150 ммоль/л NaCl и 5 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7.4) с включением ДИДС (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid) в концентрации 50 мкмоль. Клетки отмывали 2 раза 20-ти объемами того же буфера, содержащего 1% альбумина для удаления непрореагировавшего ДИДС, а затем трижды без фосфата и альбумина. В этих условиях >95% ДИДС связывается с белком полосы 3 [15].

Изменение формы эритроцитов исследовали методом регистрации изменений уровня оптической плотности (ОП) и флуктуаций ОП клеточной суспензии при перемешивании в кювете с частотой 5,0-7,0 Гц. Тестирование проводили на спектрофотометре (СФ-4А), сопряженном с самописцем при длине волны 720 нм. Оптическая плотность суспензии эритроцитов в экспериментах составляла 0,3-0,35 единиц, что соответствовало гематокриту 0,02% (~$3{,}0\times10^6$ кл./мл) [16]. Эритроциты, имеющие форму двояковогнутых дисков, рассеивают свет анизотропно. При их перемещении в суспензии анизотропия непрерывно меняется, что вызывает выраженную флуктуацию ОП. Суспензия одинаковых дискоидных клеток производит максимальную флуктуацию ОП. Если клетки представлены сфероцитами, то они дают изотропное светорассеяние независимо от их ориентации в луче света, поэтому флуктуация ОП не выявляется. Флуктуация не наблюдается при отсутствии перемешивания, это подтверждает то, что флуктуация ОП обусловлена изменением ориентации клеток в световом луче. Изменение ориентации клеток, которое не влечет за собой изменения площади светорассеяния (как в случае сферы), не приводит к возникновению флуктуации ОП. Интенсивность флуктуации ОП отражает соотношение между асимметричными и симметричными формами эритроцитов [5, 16]. Таким образом, используя данный метод, можно оценить изменения формы эритроцитов под воздействием различных реагентов.

Результаты исследования и их обсуждение

При замораживании и хранении эритроцитов в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500 и 1,2-ПД в течении 3 лет, суммарная потеря клеток после оттаивания и отмывания составляет 7-10%, что не превышает потери эритроцитов без хранения [4]. Морфологически интактные эритроциты представлены дискоцитами, стоматоцитами и эхиноцитами, а криоконсервированные – эхиноцитами (рис. 1) (эхиноцитоз III стадии [17]). Включение в среду плазмы или альбумина вызывает изменение формы клеток, которые в большей степени становятся дискоцитами как для контрольных, так и для замороженных образцов клеток (рис. 1, фото 2, 3, 6, 7). Включение в среду эхиноцитогенного реагента ДИДС вызывает образование сфероэхиноцитов как для интактных, так и для криокосервированных эритроцитов (рис. 1, фото 4, 8) (эхиноцитоз IV стадии [17]).

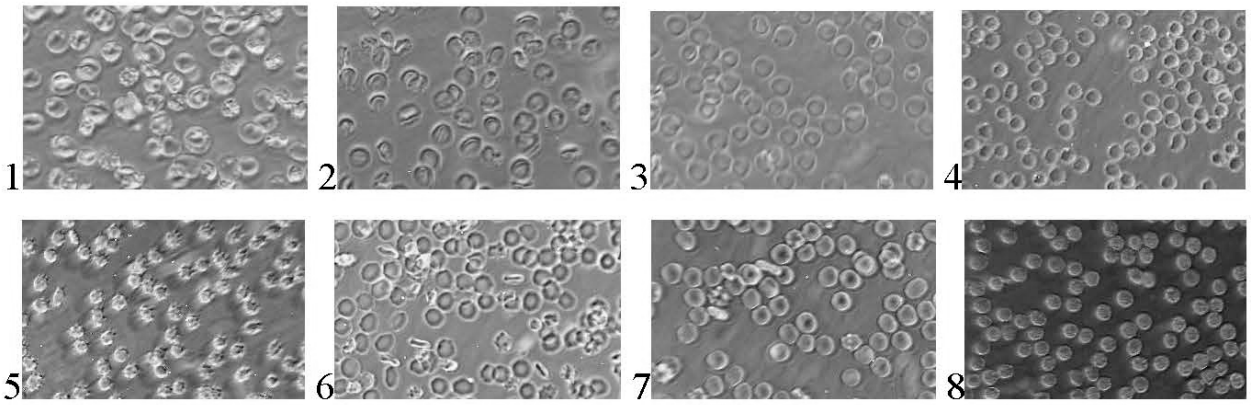


Рис. 1. Влияние плазмы (2,6), альбумина (3,7) и ДИДС (4,8) на морфологию эритроцитов, отмытых физиологическим раствором NaCl (0,9%). Концентрация плазмы, альбумина и ДИДС – 20%, 2% и 50 мкмоль/л, соответственно. 1-4 – интактные эритроциты, 5-8 – криоконсервированые эритроциты.

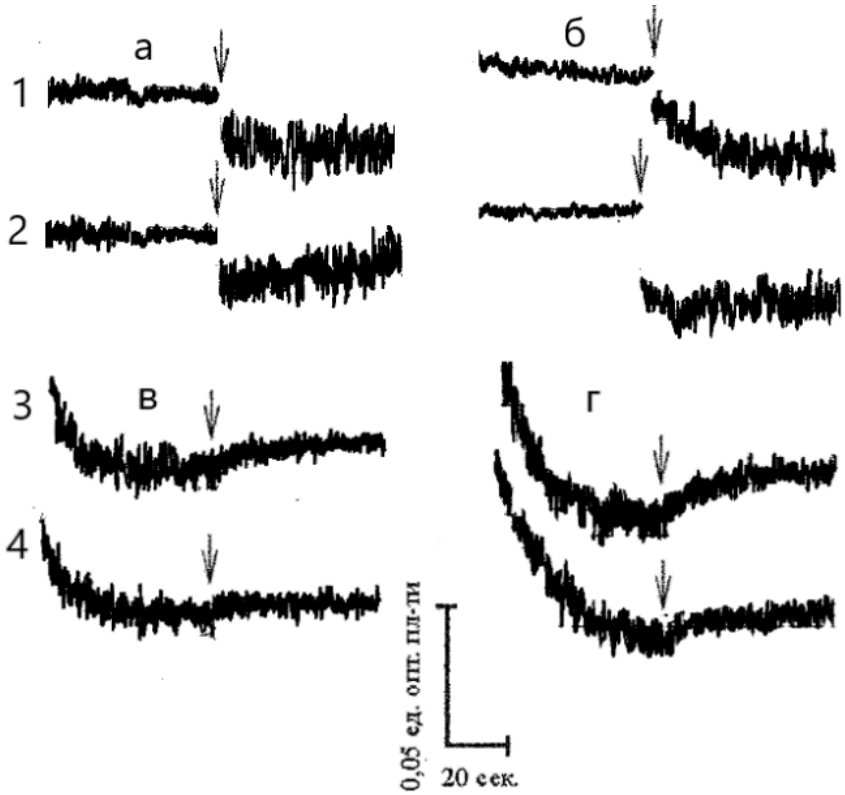


Рис. 2. Влияние альбумина (1а,б; 3 в,г), и плазмы (2а,б; 4в,г) на флуктуацию оптической плотности суспензии эритроцитов в среде, содержащей 0,15 моль NaCl, 10 ммоль трис. а, б – pH 7.4; в, г – pH 5.0. а, в – интактные эритроциты, б,г – криоконсервированные эритроциты. Концентрации реагентов: альбумин 0,02%; плазма 0,2%. Стрелками показаны моменты внесения реагентов в спектрофотометрическую кювету.

Результаты исследования флуктуации ОП в перемешиваемой суспензии эритроцитов в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (pH 7.4) показывают, что действие альбумина и плазмы вызывают снижение ОП и усиление флуктуаций ОП (рис. 2 а), что характерно для данных стабилизаторов дискоидной формы эритроцитов [5]. Криоконсервированные эритроциты проявляют несколько меньшую степень флуктуации ОП и несколько ослабленный эффект используемых реагентов (рис. 2 б в сравнения с рис. 2 а). Ослабленная интенсивность флуктуаций ОП согласуется с результатами морфологического анализа, где криоконсервированные клетки представлены эхиноцитами (рис. 1). Вместе с тем, проявление определенного уровня флуктуации указывает на преобразование части клеток в дискоциты в потоке при перемешивании суспензии (рис. 2 б). Действие альбумина и плазмы с усилением флуктуации ОП интактных и криоконсервированных эритроцитов (рис. 2 б) согласуется с морфологическим анализом, где данные агенты вызывают преобразование в дискоциты большей части клеток (рис. 1).

Учитывая отрицательный заряд молекул

альбумина при физиологическом значении pH ($pI_{альбумина}$ 4.7) [6] и его возможные электростатические эффекты, действие данного агента на форму эритроцитов тестировали при pH 5.0. Снижение pH внешней среды, которое вызывает снижение общего отрицательного заряда поверхности клетки [18], приводит к усилению флуктуации ОП при этом интенсивность ее для контрольных и замороженных эритроцитов становится практически одинаковой (большая часть клеток становятся асимметричными, вероятно, стоматоциты I стадии [17]). Динамика установления стационарного уровня ОП для криоконсервированных эритроцитов несколько выраженнее, чем для интактных клеток, что указывает на замедленность реакции при снижении pH среды (рис. 2 в, г). Характерные действия альбумина и плазмы при pH7.4 (рис. 2 а, б), очевидно, устраняются при pH 5.0, как для интактных, так и криоконсервированных эритроцитов (рис. 2 в, г). Устранение эффекта может быть связано как с нейтрализацией заряда молекул альбумина, так и с изменением заряда поверхности клетки.

Белок полосы 3 (б-п-3) – основной трансмембранный белок эритроцитов, высоко структурирован и пронизывает мембрану до 14 раз, образуя α-спиральные гидрофобные участки, объединенные гидрофильными внутриклеточными и внеклеточными поверхностными петлями; армирует фосфолипидный бислой и формирует анионный канал и переносчик [12, 19]. Обработка эритроцитов ДИДС приводит к а) необратимому связыванию данного ингибитора в анионном канале; б) фиксированию транспортных сайтов переносчика на внешней поверхности мембраны; в) распаду тетрамеров б-п-3 на димеры; г) нарушению взаимодействия данного белка с цитоскелетом посредством анкирина (б-п-2.1) [12, 15]. Клетки, меченые ДИДС в начальный момент времени при внесении в кювету, вероятно, представлены в основном сфероэхиноцитами, так как отмечается слабое проявление флуктуации ОП. Во времени отмечается развитие флуктуации с последующим ослаблением (рис. 3, трек 1). Интенсивность флуктуации ОП на 2-3-й минуте вполне сравнима с таковой для интактных клеток. Очевидно, в потоке при перемешивании клеточной суспензии в ДИДС-меченых клетках происходят обратимые изменения сфероэхиноцитов в асимметричные формы и опять к симметричным сфероэхиноцитам (рис. 3, трек 1). Асимметричные формы, вероятно, включают дискоциты, так как морфологически ДИДС-меченые эритроциты представлены сфероэхиноцитами, эхиноцитами и дискоцитами [15], что указывает на обратимые переходы между данными формами в потоке при перемешивании клеточной суспензии (рис. 3, трек 1). В тоже время, предварительное включение в среду альбумина приводит к развитию значительной флуктуации ОП, которая сравнима с таковой для интактных эритроцитов при действии альбумина (рис. 3, трек 2 по сравнению с рис. 2, трек 1, а), что указывает на преобразование сфероэхиноцитов в дискоциты [5]. Следовательно, действие альбумина на эритроциты осуществляется при значительной структурной модификации мембран.

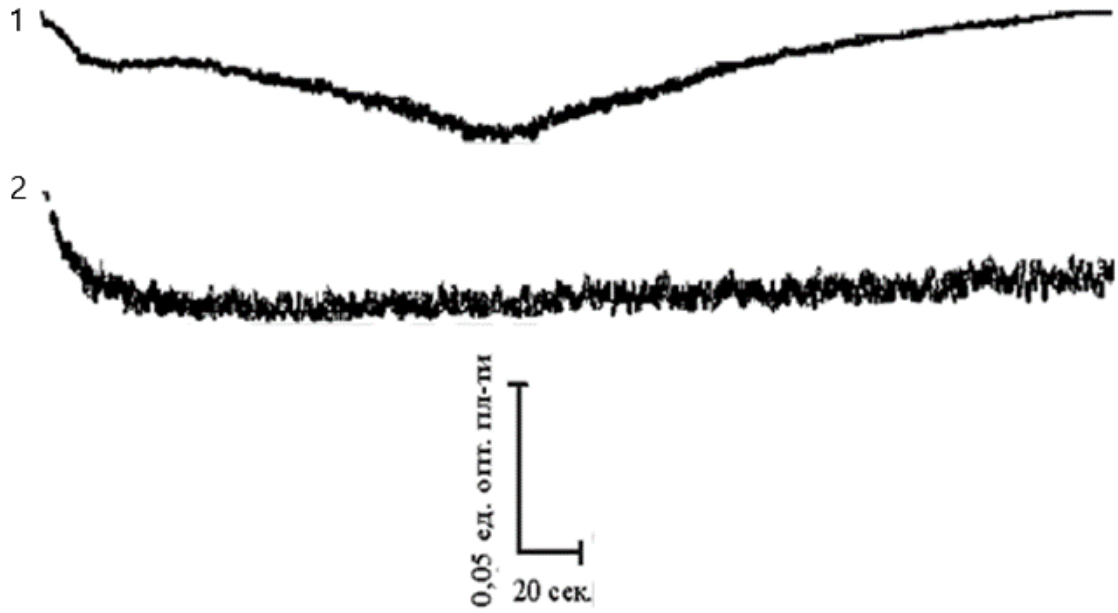


Рис. 3. Динамика изменения интенсивности флуктуации ОП суспензии эритроцитов, меченых ДИДС (см. методы), в отсутствии (трек 1) и присутствии альбумина (0,02%) (трек 2).

Способность эритроцитов к деформируемости определяется дискоидной формой с наибольшей величиной отношения площади поверхности к объему клетки. При этом липидный бислой и белковый цитоскелет ответственны за деформируемость и способствует восстановле-

нию дискообразной формы клетки [3]. Изменение формы эритроцитов может определяться соотношением распределения транспортных сайтов анионного переносчика по обе стороны мембраны, т.е., конформацией б-п-3, при этом достигнутая форма стабилизируется цитоскелетом [20]. Показано, что белок полосы 4.1 (б-п-4.1) играет важную роль в определении и поддержании нормальной формы эритроцитов. При этом морфомодифицирующее действие альбумина опосредуется цитоплазматическим доменом б-п-3, б-п-4.1 и спектрином, но не зависит от состояния анкирина [21], который также связывает б-п-3 с цитоскелетом, но данная связь нарушается при взаимодействии ДИДС с б-п-3 [15]. Полученные результаты с учетом данных литературы [12, 15] позволяют предположить, что механизм формомодифицирующего действия альбумина исключает изменение конформации анионного переносчика, изменение агрегатного состояния б-п-3 и модификацию его взаимодействия с цитоскелетом посредством анкирина.

Константа диссоциации (Кд) альбумина в эксперименте с эритроцитами составляет 8 мкмоль/л, что в 3 раза превышает таковую для экспериментальной модели альбумин-фосфолипидные мембраны, это, вероятно, связано с влиянием поверхностных белков на аффинность альбумина [22]. Предполагается, что связывание альбумина с эритроцитами определяется гидрофобными взаимодействиями, при этом мембрана становится более электроотрицательной (превышение ξ-потенциала более чем в 3 раза) [22]. К тому же установлено, что эффективность адсорбции альбумина на гидрофобных поверхностях полимеров выше, чем на гидрофильных полимерах [23]. В экспериментах по исследованию изменения флуктуации ОП суспензии эритроцитов (рис. 2, 3) концентрация альбумина составляла 0,02% (3 мкмоль/л) при гематокрите клеток 0,02%. Данная концентрация меньше величины Кд, поэтому, вероятно, действие данного агента определяется гидрофобными взаимодействиями с липидным бислоем мембраны. В экспериментах по исследованию морфологии (рис. 1) отношение концентрации альбумина (2%, соответствует 306 мкмоль/л) к количеству клеток (гематокрит 2%) соответствует соотношению в экспериментах по флуктуации ОП (рис. 2, 3). Вероятно, что дискоцит стабилизирующее действие альбумина в последнем случае также опосредуется связыванием агента с липидным бислоем мембраны с теми же сайтами. Необходимо отметить, что альбумин при физиологических концентрациях (4%) в эксперименте вызывает развитие стоматоцитоза, тем не менее, in vivo эритроциты обладают дискоидной формой. Было высказано предположение, что дискоидная форма эритроцитов уравновешивается за счет эхиноцитогенного действия глобулинов [24]. Не исключено, что развитие стоматоцитоза в эксперименте определяется дополнительными местами связывания альбумина на поверхности мембран. Повышение электроотрицательности мембран эритроцитов при связывании альбумина [22] указывает на значительный вклад изменения электростатического баланса в формомодифицирующий эффект данного агента.

Согласно одной из гипотез, регуляция формы эритроцитов при изменении pH и ионной силы среды опосредуется изменением отрицательного заряда гликокаликса [25]. С другой стороны, изменение формы эритроцитов может определяться отрицательными зарядами диссоциируемых головных групп мембранных липидов. В данном случае эхиноцитоз развивается вследствие расширения внешнего монослоя из-за усиления отталкивания между заряженными группами или усиления гидратации этих групп [26]. Учет представленных гипотез повышает возможность того, что связывание альбумина с фосфолипидным бислоем может привести не только к повышению отрицательного заряда гликокаликса [22], но и изменению электростатического баланса бислоя и, соответственно, изменению структуры мембраны.

В экспериментах по протеолитическому расщеплению на поверхности эритроцитов б-п-3 и гликофорина А (Гл-А) и по связыванию аглютининов с данными белками установлено, что регуляция формы эритроцитов при действии альбумина может опосредоваться указанными интегральными белками [24]. Показано, что фосфатидилхолин (ФХ) во внешнем монослое мембраны взаимодействует с положительно заряженными остатками аминокислот аргинина (Arg) и лизина (Lys) на б-п-3 [12]. Установлено взаимодействие положительно заряженных остатков мембранного домена б-п-3 с головными группами кислых фосфолипидов (ФС, фосфоинозитид дифосфат) во внутреннем монослое мембраны. Гл-А связывается с мембранным доменом б-п-3 не только посредством основного остатка Arg61 с кислотным остатком Glu658, но и через дополнительное взаимодействие мембранного домена б-п-3 и внеклеточной части Гл-А [19]. В электростатический баланс мембраны вносят вклад карбоксильные группы жирных кислот и второй фосфатный гидроксил фосфатидов. Указанные группы в монослоях или бислоях начинают диссоциировать выше значения pH6.0, поэтому при pH5.0 указанные группы будут нейтральными [26], что приведет к снижению общего отрицательного заряда мембраны эритроцитов [18].

Развитие эхиноцитоза при криоконсервировании и при действии ДИДС (рис. 1), возможно, связано с аналогичными механизмами модификации формы эритроцитов. Установлено, что при воздействии гиперконцентрации NaCl (3 моль/л) на мембраны эритроцитов повышается реакционная активность SH-группы, локализованной в гидрофобном фрагменте б-п-3 по от-

ношению к N-пирен-малеимиду [27]. Кроме того, данный эффект, хотя и в меньшей степени, отмечается с ДИДС-модифицированными мембранами [27], что указывает на декомпактизацию трансмембранных фрагментов б-п-3, как при действии гиперконцентрации соли как основного повреждающего фактора замораживания. В результате декомпактизации может произойти изменение характера взаимодействия б-п-3 с холестерином и фосфолипидами. Подобные нарушения отмечаются при гиперхолестеринемии, когда уровень связывания холестерина с б-п-3 возрастает, а связывание фосфатидилхолина и сфингомиелина снижается [28]. Это приводит к усилению электроотрицательности белка из-за экспонирования карбоксильных групп и имидазола гистидина, что вызывает нарушение электростатического баланса в мембранах эритроцитов из-за изменений связывающей способности отрицательно заряженных участков мембранного домена б-п-3 [28]. Молекула ДИДС при взаимодействии в анионном канале изотиоцианатной группой нейтрализует положительный заряд остатка Lys542, кроме того, в канал включаются два отрицательно заряженных сульфоната данной молекулы [29], которые могут экранировать другие положительные заряды в канале и у входа в канал [30] и изменять электростатическую структуру локальных участков мембран. Поэтому нельзя исключить роль электростатических эффектов в механизме действия ДИДС на форму эритроцитов, которые могут привести к нарушению электростатического баланса мембран.

Таким образом, при криоконсервировании эритроцитов в среде, содержащей ПЭГ-1500 и 1,2-ПД, отмечается нарушение морфологии клеток. Эритроциты представлены эхиноцитами, но восстанавливают свою форму при включении их в раствор с альбумином. Согласно одной из гипотез, регуляция формы эритроцитов определяется характером распределения транспортных сайтов анионного переносчика (б-п-3) по обе стороны мембраны. Вместе с тем, результаты указывают на то, что механизм морфомодифицирующего действия альбумина не включает изменение конформации переносчика. Кроме того, действие альбумина на форму эритроцитов не опосредуется изменением агрегатного состояния белка полосы 3 и его взаимодействием с цитоскелетом посредством анкирина. Полученные результаты позволяют предположить, что развитие структурных нарушений клеточных мембран в ходе замораживания-оттаивания сопровождается изменением электростатического баланса, вследствие ослабления гидрофобных взаимодействий между трансмембранными сегментами б-п-3. Однако данные нарушения могут быть обратимыми, так как в среде с альбумином криоконсервированные эритроциты восстанавливают свою морфологию и становятся дискоцитами. Вероятно, дискоцит стабилизирующее действие альбумина осуществляется за счет установления электростатического баланса в мембранах, характерного для дискоидной формы эритроцитов.

Выводы

1. Воздействие альбумина или плазмы на криоконсервированные эритроциты обеспечивает восстановление нормальной дискоидной морфологии клеток.

2 Воздействие или обработка эритроцитов ДИДС вызывает образование сфероэхиноцитов, которые соответствуют конечной необратимой стадии морфотрансформации. Вместе с тем, в потоке при перемешивании суспензии данных клеток выявляется обратимая ретрансформация в асимметричные формы, которые могут включать дискоциты.

3 В среде с альбумином, ДИДС-модифицированные эритроциты в потоке преобразуются в асимметричные формы, которые, возможно, включают дискоциты (нормоциты).

Перспективы дальнейших исследований

В последующей работе планируется исследовать осмотические и морфологические характеристики замороженных эритроцитов после более длительного хранения в жидком азоте (до 10 лет).

Литература

1. Reinhart WH, Piety NZ, Deuel JW, Makhro A, Schulzki T, Bogdanov N, Goede JS, Bogdanova A, Abidi R, Shevkoplyas SS. Washing stored red blood cells in an albumin solution improves their morphologic and hemorheologic properties. Transfusion. 2015 Aug;55(8):1872-81. doi: 10.1111/trf.13052.
2. Yoshida T, Prudent M, D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. Blood Transfus. 2019 Jan;17(1):27-52. doi: 10.2450/2019.0217-18.
3. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. Biomicrofluidics. 2014 Sep 17;8(5):051501. doi: 10.1063/1.4895755. eCollection.
4. Ramazanov VV, Volovelskaya EL, Koptelov VA, Bondarenko VA. Svoystvo eritrotsytov, zamorozennych v srede s polietilenglikolem i 1,2-propandiolom. Visnyk problem biologii i meditsiny. 2014; 2(3): 230-236. (Ukrainian)
5. Hoffman JF. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells. Blood Cells. 1987; 12(3): 565-88.
6. Akbarzadehlaleh P, Mirzaei M, Mashahdi-Keshtiban M, Shamsasenjan K, Heydari H. PEGylated Human Serum Albumin: Review of PEGylation, Purification and Characterization Methods. Adv Pharm Bull. 2016 Sep;6(3): 309-17. doi: 10.15171/apb.2016.043.
7. Huang YX, Wu ZJ, Mehrishi J, Huang BT, Chen XY, Zheng XJ, Liu WJ, Luo M. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. J Cell Mol Med. 2011; 15: 2634-42.
8. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. Transfusion. 2008 Sep;48(9): 1943-53. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01794.x.
9. Holovati JL, Wong KA, Webster JM, Acker JP. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. Transfusion. 2008 Aug;48(8): 1658-68. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01735.x.
10. Gordiyenko OI, Anikieieva MO, Rozanova SL, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Gordiyenko EO. Development of a model to investigate red blood cell surface characteristics after cryopreservation. Cryo Letters. May-Jun 2015; 36(3): 221-26.
11. Zemlianskykh NG. Regulatsia asimmetrichnogo raspredelenia lipidov v membrane eritrotsitiv cheloveka v prisutstvii glitserola i polietilenglikola. Tsytologya. 2020; 62(2): 1-9. (Russian)

12. Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, Sansom MS, Alguel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. Biochim Biophys Acta. 2016 Jul;1858(7 Pt A):1507-32. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.03.030.
13. Ramazanov VV, Volovelskaya EL, Koptelov VA, Bondarenko VA. Ingibitornaya effektivnost blokatorov anionnogo kanala v sredach s polimernumi krioprotektorami. Visnuk problem biologii i meditsiny. 2011; 3(3): 101-106. (Ukrainian)
14. Zemlianskykh NG, Babijchuk LA. Obrazovanie aktivnuch form kisloroda v eritrositach cheloveka pri kriokonservirovanii s glitserolom i polietilenglikolem. Biofizika. 2019; 64(4): 706-715. (Russian)
15. Van Dort HM, Knowless DW, Chasis JA, Lee G, Mohandas N, Low PS. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 2001; 276(50): 46968-974.
16. Rudenko SV, Crowe J H, Tablin F. Determination of time-dependent shape changes in red blood cells. Biochemistry (Mosc). 1998 Dec;63(12):1385-94.
17. Geekiyanage NM, Balanant MA, Sauret E, Saha S, Flower R, Lim CT, Gu Y. A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte-discocyte-echinocyte morphologies. PLoS One. 2019 Apr 19;14(4): e0215447. doi: 10.1371/journal.pone.0215447. eCollection 2019.
18. Dołowy K, Godlewski Z. Computation of the erythrocyte cell membrane parameters from electrophoretical and biochemical data: stern-like electrochemical model of the cell membrane. J Theor Biol. 1980; 84(4): 709-23. doi: 10.1016/s0022-5193(80)80029-4.
19. Kalli AC, Reithmeier RAF. Interaction of the human erythrocyte Band 3 anion exchanger 1 (AE1, SLC4A1) with lipids and glycophorin A: Molecular organization of the Wright (Wr) blood group antigen. PLoS Comput Biol. 2018 Jul 16;14(7): e1006284. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006284. eCollection 2018.
20. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. J Theor Biol. 1999 Feb 7;196(3):343-61. doi: 10.1006/jtbi.1998.0845.
21. Pestonjamasp KN, Mehta NG. Effect of antibodies to membrane skeletal proteins on the shape of erythrocytes and their ability to respond to shape-modulating agents. Important role of 4.1 protein in the determination/maintenance of the discoid shape of erythrocytes. Exp Cell Res. 1995 Jul;219(1):74-81. doi: 10.1006/excr.1995.1206.
22. Wall J, Ayoub F, O'Shea P. Interactions of macromolecules with the mammalian cell surface. J Cell Sci. 1995 Jul;108 (Pt 7):2673-82.
23. Namekawa K, Fukuda M, Matsuda M, Yagi Y, Yamamoto K, Sakai K. Nanotechnological characterization of human serum albumin adsorption on wet synthetic polymer dialysis membrane surfaces. ASAIO J. May-Jun 2009; 55(3): 236-42. doi: 10.1097/MAT.0b013e3181984229.
24. Mehta NG. Role of membrane integral proteins in the modulation of red cell shape by albumin, dinitrophenol and the glass effect. Biochim Biophys Acta. 1983 Feb 16;762(1): 9-18. doi: 10.1016/0167-4889(83)90110-6.
25. Rasia M, Bollini A. Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. Biochim Biophys Acta. 1998 Jul 17;1372(2):198-204. doi: 10.1016/s0005-2736(98)00057-1.
26. Tamura A, Fujii T. Roles of charged groups on the surface of membrane lipid bilayer of human erythrocytes in induction of shape change. J Biochem (Tokyo). 1981; 90(3): 629-34.
27. Ramazanov VV, Volovelskaya EL, Koptelov VA, Bondarenko VA. Reaktsionnaya aktivnost sulfgidrilnuch grupp membran eritrotsitov pod vliyaniem polimernuch krioprotektorov. Visnuk problem biologii I meditsiny. 2011; 4: 127-132. (Ukrainian)
28. Apuchovskaia LI, Nikiforova TN, Cholodova YuD. Strukturnue osobennosti integralnogo belka-3 membran eritrositov krus pri D-hipovitaminoze. Ukrainskiy biochimiheskiy zurnal. 1986; 58(5): 27-32. (Ukrainian)
29. Salhany JM, Schopfer LM, Kay MM, Gamble DN, Lawrence C. Differential sensitivity of stilbenedisulfonates in their reaction with band 3 HT (Pro-868-->Leu). Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Dec 5; 92(25):11844-8. doi: 10.1073/pnas.92.25.11844.
30. Falke JJ, Chan SI. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 2. Channel blockers. Biochemistry. 1986; 25(24): 7895-98.

Реферат

ВІДНОВЛЕННЯ МОРФОЛОГІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕРИТРОЦИТІВ

Рамазанов В.В., Семенченко О.Ю., Руденко С.В.

Ключові слова: еритроцити, кріоконсервування, морфологія.

При трансфузії еритроцитів значна частина клітин (~ 25%) на протязі доби утилізується селезінкою і печінкою через порушення деформованості і пошкодження клітинних мембран, одержуваних при гіпотермічному зберіганні або кріоконсервуванні. Підвищення вільного заліза в крові при руйнуванні еритроцитів веде до стимуляції окисного стресу і запалення, а також до порушення функцій основних органів. Первинним показником пошкоджень мембран еритроцитів може служити їх морфологія. В роботі досліджували морфологічні характеристики еритроцитів після кріоконсервування в середовищі, що містить ПЕГ-1500 і 1,2-ПД. Еритроцити, відмиті після відтавання і суспендовані у фізіологічному розчині NaCl, представлені ехіноцітами, в той же час, при перенесенні у розчин з альбуміном відзначається нормалізація дискоїдної форми клітин. Згідно з прийнятою концепцією регулювання форми еритроцитів визначається зміною конформації аніонного переносника, який сформований основним інтегральним білком мембран – білком смуги 3. Показано, що обробка еритроцитів ДІДС, що призводить до фіксації конформації переносника з транспортним сайтом, зверненим на зовнішню сторону мембрани, не змінює морфомодулюючу дії альбуміну. Разом з тим, при зниженні pH середовища, коли заряд альбуміну наближається до нуля, його дію усувається. Отримані результати дозволяють припустити, що при заморожуванні-відтаванні еритроцитів порушення гідрофобних взаємодій трансмембранних сегментів білка смуги 3 супроводжується зміною балансу електростатичних взаємодій. Ймовірно, дія альбуміну здійснюється за рахунок встановлення та стабілізації зазначеного балансу мембран, характерного для дискоїдної форми еритроцитів. Відновлення морфології кріоконсервованих еритроцитів перед трансфузією може сприяти поліпшенню деформованості клітин, поліпшенню системної гемодинаміки і попередження розвитку негативних клінічних наслідків.

Summary

RESTORATION OF ERYTHROCYTE MORPHOLOGY AFTER CRYOPRESERVATION

Ramazanov V.V., Semenchenko A.Yu., Rudenko S.V.

Key words: erythrocytes, cryopreservation, morphology.

During the erythrocyte transfusion, a significant part of the cells (~ 25%) is utilized by the spleen and liver in a day due to the deformations and damage to cell membranes that resulted from the hypothermic storage or cryopreservation. An increase in free iron in the blood during the decomposition of red blood cells leads to the stimulation of oxidative stress and inflammation, as well as to dysfunction of the main organs. The primary indicator of damage to the membranes of erythrocytes can be detected through the changes in their morphology. The work investigated the morphological characteristics of erythrocytes after cryopreservation in

a medium containing PEG-1500 and 1,2-PD. Erythrocytes washed after thawing and suspended in an isotonic NaCl solution are represented by echinocytes, at the same time, when placed into a solution with albumin, the cells demonstrate the restoration of their discoid shape. According to the well-established concept, the regulation of the shape of erythrocytes is determined by a change in the conformation of the anionic carrier, which is formed by the main integral membrane protein, the protein of band 3. The study has shown that the treatment of erythrocytes with DIDS, which leads to the fixation of the conformation of the carrier with the transport site facing the outer side of the membrane, does not change the morphomodulatory effect of albumin. At the same time, with a decrease in the medium pH, when the albumin charge approaches zero, its effect is eliminated. The results obtained suggest that, upon freezing-thawing of erythrocytes, the deterioration of hydrophobic interactions of transmembrane segments of the protein of band 3 is accompanied by a change in the balance of electrostatic interactions. Probably, the action of albumin is carried out due to the restoration and stabilization of the indicated balance of membranes, charactestic of the typical eruthrocyte discoid shape. Restoration of the morphology of cryopreserved erythrocytes before the transfusion can help reduce cell deformation, improve systemic hemodynamics and prevent the development of negative clinical consequences.