

УДК 577.352.3:577.322.7:57.086.13

Н.Г. Землянських\*, Л.О. Бабійчук

## Реактивація метаболізму в еритроцитах після кріоконсервування з поліетиленгліколем: стан білків та утворення активних форм кисню

UDC 577.352.3:577.322.7:57.086.13

N.G. Zemlianskykh\*, L.O. Babijchuk

### Metabolism Reactivation in Erythrocytes Cryopreserved with Polyethylene Glycol: Protein State and Reactive Oxygen Species Production

**Реферат:** Досліджено утворення активних форм кисню (АФК) і стан білків мембрано-цитоскелетного комплексу (МЦК) в еритроцитах, підданих заморожуванню-відігріванню з поліетиленгліколем (ПЕГ) і в подальшому після видалення кріопротекторного агента перенесених у фізіологічні умови *in vitro*. Результати SDS-ПААГ-електрофорезу з застосуванням β-меркаптоетанолу показали зниження вмісту спектрину в профілі МЦК кріоконсервованих еритроцитів. Використання діаміду виявило підвищення доступності –SH-груп спектрину до дії реагенту та зростання рівня високомолекулярних поліпептидних комплексів відносно контролю. Зниження вмісту білка смуги 8 (пероксиредоксину) в МЦК еритроцитів, виявлене за допомогою SDS-ПААГ електрофорезу із застосуванням β-меркаптоетанолу, вочевидь, пов'язується зі зміною його локалізації за умов підвищення утворення АФК на попередніх етапах кріоконсервування. Разом з тим під час короткочасної активації метаболізму відсутність істотних змін рівня АФК свідчить про здатність кріоконсервованих клітин контролювати окиснювальні процеси.

**Ключові слова:** еритроцит, мембрана, цитоскелет, білки, активні форми кисню, кріопротектор, поліетиленгліколь, кріоконсервування.

**Abstract:** Production of reactive oxygen species (ROS) and protein state of membrane-cytoskeleton complex (MCC) in the erythrocytes, subjected to freeze-thawing with polyethylene glycol (PEG) and subsequently transferred into physiological conditions *in vitro* after cryoprotective agent removal were examined. Results of SDS-PAGE with β-mercaptoethanol showed a decrease in spectrin content in the MCC profile of cryopreserved erythrocytes. The using of diamide revealed an increase in the accessibility of –SH groups of spectrin for the reagent and an enhanced level of high molecular weight polypeptide complexes relative to the control. A decrease in the content of protein band 8 (peroxiredoxin) in the MCC of cryopreserved erythrocytes revealed by SDS-PAGE with β-mercaptoethanol is apparently associated with a change in its localization caused by an increased ROS production at the previous stages of cryopreservation. At the same time, the absence of significant changes in the ROS production relative to the control upon the metabolism reactivation in erythrocytes indicated the ability of cryopreserved cells to control the oxidative processes during short-term incubation.

**Key words:** erythrocyte, membrane, cytoskeleton, protein, reactive oxygen species, cryoprotectant, cryopreservation, polyethylene glycol.

У сучасній медицині застосування кріоконсервованих еритроцитів визначається низкою причин [13]. Дозволені в клінічній практиці методи низькотемпературного зберігання крові засновані на ендоцелюлярному кріопротекторному агенті (КПА) гліцеролі. Кріоконсервовані еритроцити зберігають високу життєздатність в руслі крові після трансфузії, але їх застосування можливе тільки за умов видалення КПА [20]. Присутність гліцеролу в цитоплазмі створює умови для осмотичного шоку після перенесення клітин до ізотонічного середовища. У зв'язку з цим актуальними є дослідження, спрямовані на спрощення або виключення етапу видалення КПА. Одним із шляхів вирішення даної проблеми може бути застосування екзоцелюлярних КПА. Пос-

A number of reasons stipulates the use of cryopreserved erythrocytes in current medicine [9]. The allowed in clinical practice methods for blood low temperature storage are based on endocellular cryoprotective agent (CPA) glycerol. Cryopreserved erythrocytes maintain a high viability in bloodstream after transfusion, but their use is only possible after CPA removal [16]. Glycerol presence in cytoplasm provides the conditions for osmotic shock after cell transfer into an isotonic medium. In this regard, of topicality are the studies aimed either to simplify or eliminate the CPA removal step. The use of exocellular CPAs may be one of the ways in this task solving. When their concentration decreases gradually in bloodstream, it eliminates the need to remove a protective substance from cell suspension.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: nzemliansky@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: nzemliansky@gmail.com

Надійшла 16.02.2021

Прийнята до друку 18.05.2022

Received 16, February, 2021

Accepted 18, May, 2022

© 2022 N.G. Zemlianskykh, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

тупове зниження їхньої концентрації в руслі крові виключає необхідність видалення захисної речовини з клітинної суспензії. Однак еритроцити, кріоконсервовані під захистом різних екзоцелюлярних КПА, виявляються нестабільними в фізіологічних умовах [1, 23]. Це стосується й поліетиленгліколю (ПЕГ) з молекулярною масою 1500, незважаючи на його здатність забезпечувати високу збереженість еритроцитів людини після заморожування-відігрівання [1]. Нестабільність кріоконсервованих клітин у фізіологічних умовах *in vitro* може бути обумовлена як безпосередніми порушеннями структури окремих субклітинних компонентів, так і регуляторними процесами, що контролюють структуру мембрани [2]. Відомо, що білки мембрано-цитоскелетного комплексу (МЦК) відіграють важливу роль у забезпеченні функціональних властивостей еритроцитів у руслі крові. Тому дослідження модифікації білків МЦК клітин, кріоконсервованих із ПЕГ, під час реактивації метаболічних процесів після перенесення у фізіологічні умови *in vitro* може бути корисним для розуміння механізмів порушень, що впливають на функціональну повноцінність еритроцитів, і використовуватися як інструмент для цілеспрямованого коригування негативних процесів у них.

Електрофоретичний аналіз білків є досить інформативним способом виявлення модифікацій білків МЦК еритроцитів, підданих заморожуванню-відігріванню. Варіація умов підготовки білкових препаратів для електрофорезу дозволяє визначити різні аспекти реорганізації МЦК. Наприклад, зміни структури макромолекул можуть сприяти дисоціації окремих компонентів з МЦК у цитозоль або, навпаки, їх переходу в МЦК із цитозолу. Такі зміни виявляються у процесі вивчення поліпептидного складу тіней еритроцитів (ізольований МЦК) з використанням відновлювального реагенту  $\beta$ -меркаптоетанолу в солубілізуючому буфері, який забезпечує отримання повного спектра окремих поліпептидів МЦК [10].

Застосування білок-зшивного реагенту діаміду дозволяє встановити зміни структури макромолекул, які пов'язані з порушеннями локалізації  $-SH$ -груп. Даний реагент виявився ефективним за результатами аналізу модифікацій білків МЦК еритроцитів [3] і вільних білків сироватки плацентарної крові [6]. Реагування діаміду з  $-SH$ -групами білків викликає утворення  $-S-S-$ -містків між поліпептидами, в результаті чого виникають високомолекулярні поліпептидні комплекси (ВПК), які виявляються методом електрофорезу на стартовій позиції гелю [12]. Включення білків

However, the erythrocytes cryopreserved with different exocellular CPAs occur to be unstable under physiological conditions [3, 19]. This also applies to polyethylene glycol (PEG) with molecular weight 1500, despite its ability to ensure a high survival of human erythrocytes after freeze-thawing [3]. The instability of cryopreserved cells under physiological conditions *in vitro* may be due to both direct structural disorders of individual subcellular components and regulatory processes that control the membrane structure [22]. Proteins of membrane-cytoskeleton complex (MCC) are known to play a key role in ensuring the functional properties of erythrocytes in the bloodstream. Therefore, the study of protein modification of MCC in cells, cryopreserved with PEG during metabolism reactivation after their transfer into physiological conditions *in vitro* is useful to understand the disorder mechanisms, affecting the functional integrity of erythrocytes and may be applied as a tool for targeted correction of negative processes in cells.

Electrophoretic analysis of proteins is quite an informative way to detect the protein modifications in erythrocyte MCC, subjected to freeze-thawing. Varying the conditions to prepare the protein samples for electrophoresis enables detecting different aspects of MCC reorganization. For example, the structural changes in macromolecules can promote the dissociation of individual components out of MCC into cytosol or, conversely, their transition from cytosol into MCC. Such changes are revealed when studying the polypeptide composition of erythrocyte ghosts (isolated MCC) using the reducing reagent  $\beta$ -mercaptoethanol in a solubilization buffer, that ensures obtaining a full range of individual polypeptides of MCC [5].

The use of protein-crosslinking reagent diamide enables detecting the structural changes in macromolecules, associated with disorders in  $-SH$ -group localization. Based on the results of protein modification analysis of erythrocyte MCC [23] and free proteins of placental blood serum, this reagent occurred to be efficient [6]. The reaction of diamide with protein  $-SH$  groups induces the formation of  $-S-S-$  bridges between polypeptides, as a result which the high molecular weight polypeptide complexes (HMWPC) appear, being detected with electrophoresis at starting position of the gel [8]. The proteins' incorporation into HMWPC depends on their structural state, determining the accessibility of 'crosslinking' reagent to  $-SH$  groups and may change under exposure to physical and chemical factors. As a result of polypeptide incorporation into HMWPC composition, its relative content in the MCC protein profile decreases. Thus, the analysis



у ВПК залежить від їхнього структурного стану, який визначає доступність «зшивного» реагенту до –SH-груп і може змінюватися під впливом фізико-хімічних факторів. Внаслідок включення поліпептиду до складу ВПК його відносний вміст у профілі білків МЦК знижується. Таким чином, аналіз білкового профілю тіней еритроцитів за допомогою SDS-ПААГ-електрофорезу та змін рівня індукованих діамідом ВПК відображає ступінь модифікації білків МЦК. У даному випадку підготовка білків для електрофоретичного аналізу виключає використання  $\beta$ -меркаптоетанолу в солюбілізуючому буфері, оскільки важливо зберегти усі –S–S– зв'язки між компонентами ВПК.

Окиснювальні процеси, індуковані заморожуванням-відігріванням клітин, також можуть сприяти модифікації білків. Утворення таких активних форм кисню (АФК), як супероксидний радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), перекис водню ( $H_2O_2$ ) і гідроксил-радикал ( $\bullet OH$ ), викликає хімічну трансформацію компонентів МЦК. Важливо відзначити, що клітинні компоненти можуть реагувати на підвищення рівня АФК навіть в умовах, коли інтенсивність їх утворення незначно перевищує контрольні значення. При цьому окиснення білків може бути сприйнято як регуляторний сигнал, що впливає на білок-білкові взаємодії [22].

Мета роботи — оцінка просторово-конформаційної модифікації білків мембрано-цитоскелетного комплексу та змін інтенсивності утворення активних форм кисню в еритроцитах людини, кріоконсервованих у присутності поліетиленгліколю, після видалення кріопротекторного агента і перенесення клітин у фізіологічні умови *in vitro*.

### Матеріали і методи

У роботі використовували такі реагенти: Тріс, HEPES, акриламід, біс-акриламід, діамід, фенілметилсульфонілфторид (PMSF), азид натрію ( $NaN_3$ ), EDTA, додецилсульфат натрію (SDS),  $\beta$ -меркаптоетанол, барвник Coomassie BB G-250, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH2-DA) (Sigma, США); бромфеноловий синій (Serva, Німеччина); ПЕГ з м. м. 1500 (Fluka, США); трихлороцтова кислота, KCl,  $MgCl_2$ , NaCl,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  (х. ч. або ос. ч.) виробництва України та Росії.

Об'єктом дослідження була кров донорів, яку надали у Центрі служби крові (м. Харків, Україна). Еритроцити осаджували центрифугуванням при 1200g протягом 7 хв при 20–25°C, видаляли плазму і лейкоцитарний шар. Відмивання еритроцитів у розчині, що містить 150 mM NaCl і

of protein profile of erythrocyte ghosts using SDS-PAGE electrophoresis and a changed level of diamide-induced HPCs reflects the modification rate of MCC proteins. In this case, when preparing the proteins for analysis, the use of  $\beta$ -mercaptoethanol in a solubilization buffer is excluded, since of importance is to preserve all the –S–S– bonds between HMWPC components.

Oxidative processes induced by cell freeze-thawing may also contribute to protein modification. The production of such reactive oxygen species (ROS) as superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ) causes the chemical transformation of MCC components. The cell components may notably respond to an increased ROS level even when the intensity of their production slightly exceeds the control values. In this case, the protein oxidation may be assumed as a regulatory signal, affecting the protein-protein interactions [18].

The research aim herein was to evaluate the spatial-conformational modification of proteins of membrane-cytoskeletal complex and changes in the intensity of reactive oxygen species production in human erythrocytes cryopreserved with PEG followed by CPA removal and cell transfer into physiological conditions *in vitro*.

### Materials and methods

In this research, the following reagents were used: Tris, HEPES, acrylamide, bis-acrylamide, diamide, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), sodium azide ( $NaN_3$ ), EDTA, sodium dodecyl sulfate (SDS),  $\beta$ -mercaptoethanol, Coomassie BB G-250 dye, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH2-DA) (Sigma, USA); bromophenol blue (Serva, Germany); PEG 1500 (Fluka, USA); trichloroacetic acid, KCl,  $MgCl_2$ , NaCl,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  (chemically pure or high pure grades) manufactured in Ukraine and Russia.

The research object was the donated blood provided by the Blood Service Center (Kharkiv, Ukraine). Erythrocytes were precipitated by centrifugation at 1200g for 7 min at 20–25°C, and the plasma and buffy coat layer were removed. The erythrocytes were washed out in the solution containing 150 mM NaCl and 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) by thrice centrifugation using the same mode (the ratio of cell mass and solution was approximately 1:7). The erythrocytes resuspended in modified Ringer's solution (125 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM  $CaCl_2$ ; 32 mM HEPES (pH 7.4); 5 mM glucose) were used as the control.

To prepare for freezing, the erythrocytes were incubated in the medium containing 0.2 M PEG;



10 mM Трис-НСl (рН 7,4), виконували триразовим центрифугуванням в аналогічному режимі (співвідношення клітинної маси й розчину складало приблизно 1:7). Еритроцити, які ресуспендували в модифікованому середовищі Рінгера (125 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 32 mM HEPES (рН 7,4); 5 mM глюкози), використовували як контроль.

Для підготовки к заморожуванню еритроцити інкубували в середовищі, яке містить 0,2 М ПЕГ; 0,15 М NaCl; 0,01 М Трис-НСl (рН 7,4), протягом 30 хв при 37°C. Зразки заморожували шляхом швидкого занурення у рідкий азот (-196°C), а відігрівали на водяній бані при 37°C з інтенсивним погойдуванням. Розморожені еритроцити осаджували центрифугуванням (5 хв, 1200g), ретельно видаляли супернатант і зруйновані клітини. Потім до осаджених клітин (~ 1 мл) додавали 8 мл розчину (150 mM NaCl; 10 mM Трис-НСl (рН 7,4)) і центрифугували 5 хв при 1200g. З осаду відбирали аліквоти еритроцитів і ресуспендували в середовищі Рінгера для отримання необхідної концентрації клітин у кожній серії експериментів.

Для обробки діамідом на першому етапі експериментів еритроцити, підготовлені відповідно до вищеописаних процедур, ресуспендували в розчині Рінгера до кінцевого гематокриту 10%. Усі зразки ділили на дві частини, до однієї з яких додавали діамід до кінцевої концентрації 2,5 mM. Еритроцити інкубували в присутності діаміду або без нього протягом години при 37°C.

Після завершення інкубації клітин отримували тіні еритроцитів [10]. Клітини піддавали лізису при 2–5°C розчином, що містить 10 mM натрій-фосфатного буфера (рН 8,0) і 0,1 mM PMSF (співвідношення об'ємів клітинної суспензії та розчину становило ~ 1:30), а потім центрифугували при 20000g протягом 10 хв при 4°C. Відмивання тіней від гемоглобіну повторювали двічі з використанням лізувального середовища, яке не містило PMSF. Аліквоти осаджених тіней еритроцитів, інкубованих із діамідом, розчиняли в Sample-буфері: 0,05 М Трис-НСl (рН 6,8); 2% SDS; 20% гліцерину; 0,7 мг/мл PMSF; 0,4 мг/мл NaN<sub>3</sub>; 0,01% бромфенолового синього. Зразки, інкубовані без діаміду, розчиняли в Sample-буфері аналогічного складу з включенням 5% β-меркаптоетанолу.

Електрофорез білків тіней еритроцитів проводили в камері «Bio Rad Protean II Multi-Gel Casting chamber» (Bio Rad, США) в SDS-ПААГ за системою Лемлі [10]. Градієнтний роздільний гель відповідав концентрації полімеризуваль-

0.15 M NaCl; 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) for 30 min at 37°C. Samples were frozen via rapid immersion into liquid nitrogen (-196°C) and thawed in a water bath at 37°C with intensive shaking. The frozen-thawed erythrocytes were precipitated by centrifugation (5 min, 1200g), and the supernatant and destroyed cells were carefully removed. Then, the precipitated cells (~1 ml) were supplemented with 8 ml of the solution (150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)) and centrifuged for 5 min at 1200 g. The erythrocyte aliquots were collected from sediment and resuspended in Ringer's solution to obtain the required cell concentration in each series of experiments.

For treatment with diamide at the first step of the experiments, the erythrocytes, prepared in accordance with the above procedures, were resuspended in Ringer's solution up to 10% final hematocrit. All the samples were divided into two parts; the one of them was supplemented with diamide to a final concentration of 2.5 mM. Erythrocytes were incubated with or without diamide for one hour at 37°C.

The erythrocyte ghosts were obtained after cell incubation completing [5]. Cells were lysed at 2–5°C by the solution containing 10 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) and 0.1 mM PMSF (volume ratio of cell suspension and solution was ~ 1:30), and then centrifuged at 20 000g for 10 min at 4°C. The ghost washing out of hemoglobin was repeated twice using a lysing PMSF-free medium. The aliquots of precipitated erythrocyte ghosts, incubated with diamide were dissolved in Sample buffer: 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8); 2% SDS; 20% glycerol; 0.7 mg/ml PMSF; 0.4 mg/ml NaN<sub>3</sub>; 0.01% bromophenol blue. The samples incubated without diamide were dissolved in the Sample buffer of the same composition, supplemented with 5% β-mercaptoethanol.

Electrophoresis of erythrocyte ghost proteins was performed in Bio Rad Protean II Multi-Gel Casting Chamber (Bio Rad, USA) in SDS-PAGE according to Laemmli system [5]. Gradient separating gel corresponded to 5–20% concentration of polymerizing substances (acrylamide, bis-acrylamide). Proteins in gel were fixed in 10% trichloroacetic acid and stained with Coomassie BB G-250 at room temperature during 1 hour. The dye excess was washed out with 7% acetic acid solution. Identification of gel fractions was controlled with a set of marker proteins (Fermentas life sciences Page Ruler SM0661, Thermo Fisher Scientific, Lithuania). The proteins (relative changes in polypeptide content) were qualitative evaluated using 'Gel' software (Certificate No. 23683, State Depart-



них речовин (акриламід, біс-акриламід) 5–20%. Білки в гелі фіксували в 10% трихлороцтової кислоти і забарвлювали за допомогою Coomassie BB G-250 при кімнатній температурі протягом години. Надлишок барвника відмивали розчином 7%-ї оцтової кислоти. Ідентифікацію фракцій гелю контролювали набором маркерних білків (Fermentas life sciences Page Ruler SM0661, Thermo Fisher Scientific, Литва). Кількісну оцінку білків (відносні зміни вмісту поліпептидів) виконували за допомогою програмного забезпечення «Gel» (Свідоцтво № 23683, Держдепартамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України від 12.02.2008, ІПКіК НАН України, Україна).

Для визначення АФК на початковому етапі експерименту аліквоти кріоконсервованих клітин (50 мкл) після видалення КПА (як описано вище), ресуспендували в розчині Рінгера до концентрації близько  $4 \times 10^7$  кл/мл та інкубували протягом години при 37°C. Контрольні клітини інкубували аналогічним чином у середовищі Рінгера. Після закінчення інкубації до 50 мкл кожного зразка додавали розчин DCFH2-DA (кінцева концентрація  $4 \times 10^{-5}$  М) та інкубували в темряві при 37°C протягом 30 хв. Потім додавали 250 мкл відповідних середовищ із метою зниження концентрації клітин для вимірювань показників флуоресценції DCF (довжина хвилі максимуму збудження/емісії 495/529 нм) методом проточної цитофлуориметрії на приладі «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США). Дані аналізували за допомогою програми «WinMDI 2.8» (Scripps Research Institute, США).

Статистичну обробку результатів виконували з використанням програмного пакета «Statgraphics plus 2.1 for Windows» (Statistical Graphics Corp., США). Дані перевірено на нормальність розподілу за допомогою тесту Колмогорова-Смирнова і представлено у вигляді  $M \pm SD$  (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення). Експерименти проводили на зразках крові чотирьох донорів ( $n = 4$ ). Статистичну значущість розходжень між групами оцінювали за допомогою критерію Вілкоксона. Дані вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Видалення екзоцелюлярних КПА з клітинної суспензії є обов'язковою процедурою. Однак для визначення стану білків МЦК після заморожування-відігрівання еритроцитів та їхньої здатності до адекватного виконання своїх функцій після трансфузії необхідно було відт-

тмент of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine of February 12, 2008, IPC&C of the NAS of Ukraine, Ukraine).

For ROS detection at an initial stage of the experiment, after CPA removal (as described above) the aliquots of cryopreserved cells (50  $\mu$ l) were resuspended in Ringer's solution up to the concentration of about  $4 \times 10^7$  cells/ml and incubated within 1 hour at 37°C. Control cells were incubated by a similar way in Ringer's solution. After incubation completing, 50  $\mu$ l of each sample were supplemented with DCFH2-DA solution (final concentration of  $4 \times 10^{-5}$  M) and incubated in the dark at 37°C for 30 min. Then, 250  $\mu$ l of the corresponding media were added for reducing cell concentration to measure DCF fluorescence parameters (excitation/emission maximum wavelength of 495/529 nm) by flow cytometry using a FACS Calibur instrument (Becton Dickinson, USA). The data were analyzed using the WinMDI 2.8 software (Scripps Research Institute, USA).

The results were statistically processed using the Statgraphics plus 2.1 for Windows software package (Statistical Graphics Corp., USA). Data were tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test and presented as  $M \pm SD$  (mean  $\pm$  standard deviation). Experiments were performed in blood samples obtained from four donors ( $n = 4$ ). The significance of the differences between groups was assessed using the Wilcoxon test. Data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

Removal of exocellular CPAs from cell suspension is an optional procedure. However, in order to determine the state of MCC proteins after erythrocyte freeze-thawing and their ability of adequate functioning after erythrocyte transfusion, it was necessary to reproduce the conditions, when the metabolic processes were activated in cells if there was no CPA. Therefore, PEG was removed after erythrocyte thawing, and cells were incubated at 37°C in a modified Ringer's solution supplemented with glucose.

Electrophoretic analysis of erythrocyte ghost proteins after PEG removal, performed using  $\beta$ -mercaptoethanol (with no diamide), showed the distribution of protein fractions to be different from the control values. The changes revealed a decreased spectrin content ( $(19.3 \pm 0.5)$  vs.  $(22.7 \pm 0.6)\%$  in the control,  $p < 0.05$ ), as well as quite a complete disappearance of protein band 8 (Fig. 1A, lanes 2 and 3).

The diamide effect on MCC proteins of control cells and frozen-thawed erythrocytes after PEG

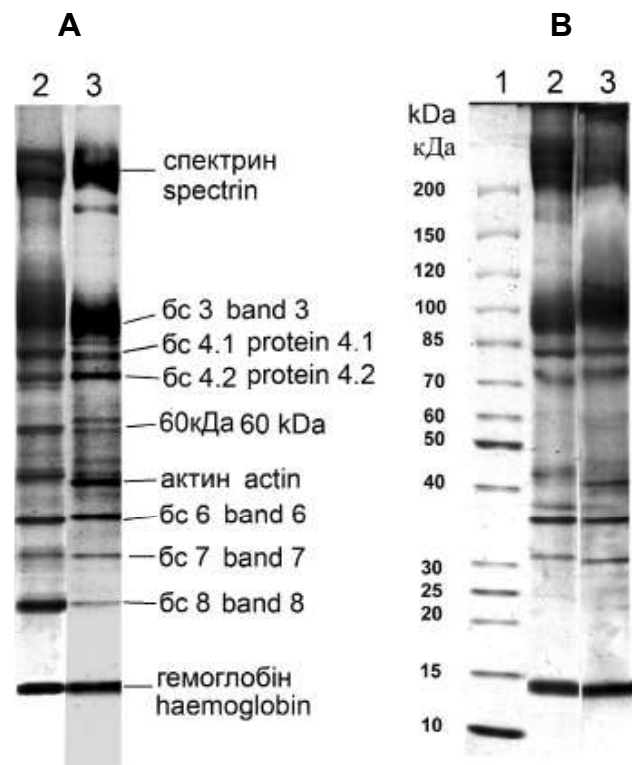


ворити умови, за яких у клітинах активуються метаболічні процеси за відсутності КПА. Тому після розморожування еритроцитів ПЕГ видаляли, а клітини інкубували при 37°C у модифікованому середовищі Рінгера з додаванням глюкози.

Електрофоретичний аналіз білків тіней еритроцитів після видалення ПЕГ, виконаний з використанням  $\beta$ -меркаптоетанолу (без діаміду), показав, що розподіл білкових фракцій відрізняється від контрольних показників. Виявлені зміни полягають у зниженні вмісту спектрину ((19,3  $\pm$  0,5) проти (22,7  $\pm$  0,6) % у контролі,  $p < 0,05$ ), а також у практично повному зникненні білка смуги 8 (рис. 1А, доріжки 2 і 3).

Дія діаміду на білки МЦК контрольних клітин і розморожених еритроцитів після видалення ПЕГ характеризує модифікації в структурі білків, пов'язані зі змінами локалізації -SH-груп та їхньої доступності для реагенту. За обраних умов експонування еритроцитів з діамідом (концентрація і тривалість інкубації) в контрольних еритроцитах лише невелика частина білків МЦК залучалася до утворення ВПК (рис. 1В, доріжка 2). Поява ВПК супроводжувалася зниженням вмісту спектрину, білків смуг 3 і 5, а також практично повним зникненням з білкового профілю білка з м. м. 60 кДа і білка смуги 8, що підтверджувалося результатами кількісного аналізу денситограм (таблиця). Інкубація клітин з діамідом після видалення ПЕГ із суспензії розморожених еритроцитів і реактивації метаболізму виявила статистично значуще збільшення кількості ВПК та зменшення вмісту спектрину (рис. 1В, доріжка 3, таблиця) порівняно з контролем.

Таким чином, у кріоконсервованих під захистом ПЕГ еритроцитах встановлено зниження вмісту спектрину відносно контролю, яке було визначено як з використанням діаміду, так і без нього, що вказує на складний механізм модифікації білка. Виявлені порушення можуть ініціюватися змінами конформації окремих повторюваних трьохспіральных сегментів  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць спектрину, які є нестабільними, навіть у фізіологічних умовах [8, 16]. Очевидно, що після екстремальних впливів ймовірність порушень структури спектрину в цих ділянках макромолекул значно зростає. Анфолдинг окремих сегментів спектрину змінює стабільність всієї об'єднаної системи МЦК еритроцитів [16, 24], оскільки нестабільні сегменти беруть участь у формуванні вертикальних контактів з анкірином, а також з молекулами



**Рис. 1.** SDS-ПААГ-електрофорез білків тіней еритроцитів людини, підданих заморожуванню-відігріванню з ПЕГ і в подальшому перенесених у фізіологічні умови *in vitro* після видалення КПА. **А** — електрофорез, виконаний із застосуванням  $\beta$ -меркаптоетанолу; **В** — електрофорез, виконаний із застосуванням діаміду. 1 — маркерні білки; 2 — контрольні еритроцити, 3 — еритроцити, піддані заморожуванню-відігріванню з ПЕГ і в подальшому після видалення КПА перенесені у фізіологічні умови *in vitro*; бс — білок смуги. Представлено дані типового експерименту.

**Fig. 1.** SDS-PAGE of proteins of ghosts from human erythrocytes, subjected to freeze-thawing with PEG and further transferred into physiological conditions *in vitro* after CPA removal. **A** – electrophoresis performed with  $\beta$ -mercaptoethanol; **B** – electrophoresis performed with diamide. 1 – marker proteins; 2 – control erythrocytes; 3 – erythrocytes subjected to freeze-thawing with PEG and further after CPA removal, transferred into physiological conditions *in vitro*. The data from a typical experiment are presented.

removal characterizes the modifications in protein structure associated with changes in -SH groups' localization and their accessibility to the reagent. Under selected conditions of erythrocyte exposure with diamide (concentration and incubation duration), only a small part of MCC proteins in control erythrocytes was involved in HMWPC formation (Fig. 1, lane 2). The HMWPC appearance was accompanied by a decrease in spectrin content, band 3 and 5 proteins, as well as a virtually complete disappearance of protein with m.w. 60 kDa and protein band 8 from the protein profile, that was confirmed by the results of quantitative analysis of densitograms (Table). Cell incubation with dia-

Електрофоретичний аналіз білків МЦК еритроцитів, кріоконсервованих під захистом ПЕГ, після видалення КПА і перенесення клітин у фізіологічні умови *in vitro* ( $n = 4$ )

Electrophoretic analysis of MCC proteins of erythrocytes cryopreserved with PEG after CPA removal and cell transfer into physiological conditions *in vitro* ( $n = 4$ )

Фракції білків, % Protein fractions, %	Експериментальні групи еритроцитів Experimental groups of erythrocytes		
	Нативні Native	Оброблені діамідом Diamide-treated	
		Контрольні Control	Заморожені з ПЕГ Frozen with PEG
ВПК HMWPC	–	7,4 ± 0,6	11,9 ± 1,4*
Спектрин Spectrin	22,7 ± 0,6	18,5 ± 0,8#	16,2 ± 0,5#,*
Білок смуги 3 Band 3	21,1 ± 1,4	17,1 ± 0,9#	15,7 ± 0,8
Білок смуги 4.1 Protein 4.1	4,3 ± 0,6	4,2 ± 0,9	4,1 ± 0,1
Білок смуги 5 Band 5	4,8 ± 0,7	3,4 ± 0,5#	3,6 ± 0,5#
Білок смуги 6 Band 6	4,2 ± 1,0	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,9
Білок смуги 8 Band 8	3,5 ± 0,6	–	–

**Примітки:** Вміст окремих білкових фракцій представлено відносно загальної кількості білка в пробі (%): # — статистичні відмінності між групами еритроцитів, оброблених та необроблених діамідом; \* — статистичні відмінності між групами еритроцитів, оброблених діамідом;  $p < 0,05$ .

**Notes:** Content of individual protein fractions is presented relative to the total amount of protein in the sample (%): # – statistical differences between groups of erythrocytes with and without diamide treatment; \* – statistical differences between the diamide-treated erythrocyte groups;  $p < 0,05$

адгезії Lu/BCAM [7], які входять до складу макрокомплексу на основі білка смуги 3 [9, 16]. Структурні порушення спектрину еритроцитів, заморожених у присутності ПЕГ, можуть бути причиною фрагментації мембрани та нестійкості клітин у фізіологічних умовах.

Зміна вмісту білка смуги 8 у профілі МЦК еритроцитів, кріоконсервованих у присутності ПЕГ, яка була виявлена у процесі інкубації клітин за відсутності діаміду, вказує на залучення даного компонента в контролювання стабільності клітин і може бути пов'язана з активацією окисних процесів у клітині. Білок смуги 8, ідентифікований як пероксиредоксин 2 [21], містить функціональну легкодоступну –SH-групу цистеїну і бере участь у захисті клітин від окислювального стресу [19]. Тому після інкубування контрольних еритроцитів з діамідом він практично повністю втрачається з білкового профілю, переходячи до складу ВПК (рис 1 В, доріжка 2). Відомо, що пероксиредоксин першим реагує з АФК при збільшенні їх продукції, оскільки чутливість –SH-групи інших білків до  $H_2O_2$  на декілька порядків нижча [18]. Враховуючи той факт, що ПЕГ сприяє утворенню АФК в умовах інку-

миде after PEG removal from the frozen-thawed erythrocyte suspension and metabolism reactivation disclosed a significant increase in the amount of HMWPC and a decrease in spectrin content (Fig. 1B, lane 3, Table) vs. the control.

Thus, a decrease in spectrin content relative to the control was found in the erythrocytes cryopreserved with PEG, detected both with and without diamide, thereby emphasizing a complex mechanism of protein modification. The noted disorders may be initiated by changes in conformation of individual triple helical repeats of  $\alpha$ - and  $\beta$ -spectrin subunits, being unstable even under physiological conditions [2, 12]. It is obvious, that after extreme exposures the probability of spectrin structure disorders in these sites of macromolecules significantly increases. Unfolding of individual spectrin segments changes the stability of the entire integrated system of erythrocyte MCC [12, 20], since the unstable segments are involved in formation of vertical contacts with ankyrin, as well as with Lu/BCAM adhesion molecules [11], being a part of the band 3 protein-based macrocomplex [4, 12]. Structural disorders of spectrin in the erythrocyte frozen in PEG presence may be

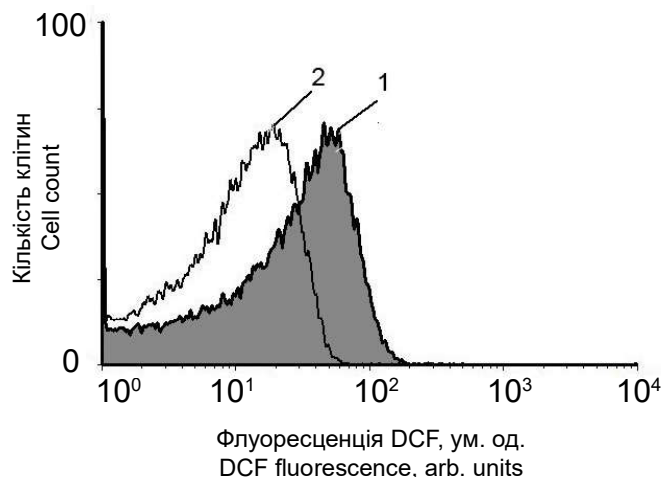




бації еритроцитів на етапах, які передують заморожуванню [5], можна очікувати включення пероксиредоксину в контролювання окиснювальних процесів у клітині, що змінює його локалізацію в умовах реактивації метаболізму в кріоконсервованих клітинах (перехід з мембранозв'язаного стану в цитозоль). Внаслідок таких процесів білок смуги 8 не виявляється в електрофоретичному профілі МЦК заморожених із ПЕГ еритроцитів після видалення КПА (рис. 1А, доріжка 3). Таким чином, пошкодження клітин у процесі заморожування-відігрівання, вочевидь, викликані не тільки безпосереднім порушенням просторово-конформаційного стану білків МЦК під впливом екстремальних факторів середовища, а й вторинними змінами білків, пов'язаними з розвитком окиснювального стресу.

Утворення АФК, виявлене за допомогою реагенту DCFH<sub>2</sub>-DA, характеризує потенціал розвитку окислювальних процесів у клітинах, оскільки відображає реальний рівень формування оксидативних радикалів. Після проникнення в клітину реагент деацетилюється, залишаючись нефлуоресцентною сполукою (DCFH<sub>2</sub>) до моменту його окиснення АФК і перетворення в DCF. Таким чином, зростання флуоресценції DCF, яке характеризується значенням медіани гістограм розподілу, відображає підвищення утворення АФК у клітині.

Визначення рівня флуоресценції DCF в еритроцитах, кріоконсервованих під захистом ПЕГ, за умов їх перенесення в розчин Рінгера після видалення КПА показало, що медіана гістограм розподілу знижується відносно контролю з (25,9 ± 3,1) до (18,5 ± 2,8) ум. од.;  $p < 0,05$ ,  $n = 4$  (рис. 2, гістограма 2). Причини такого зсуву можуть бути пов'язані зі змінами субпопуляційного складу суспензії еритроцитів, викликаного гемолізом, тобто загибеллю клітин з вираженими пошкодженнями мембрани в процесі видалення КПА. Необхідно відзначити, що представлені результати характеризують утворення АФК у кріоконсервованих еритроцитах протягом лише короткочасного спостереження (години), що не виключає подальших змін досліджуваного параметра. Раніше було оцінено відстрочені наслідки дії екстремальних факторів заморожування-відігрівання на утворення АФК в еритроцитах, кріоконсервованих із гліцеролом та ПЕГ, після їхнього гіпотермічного зберігання [5]. Виявлено, що в еритроцитах, кріоконсервованих з ПЕГ, навіть після видалення КПА відмічається підвищення утворення АФК порівняно з контрольними зразками і клітинами, замороженими з гліцеролом [5].



**Рис. 2.** Зміна інтенсивності флуоресценції DCF в еритроцитах, підданих заморожуванню-відігріванню з ПЕГ і в подальшому після видалення КПА перенесених у фізіологічні умови *in vitro*. 1 — контроль (сірий фон гістограми); 2 — еритроцити, піддані заморожуванню-відігріванню з ПЕГ і в подальшому після видалення КПА перенесені у фізіологічні умови *in vitro*. Представлено дані типового експерименту.

**Fig. 2.** Change in DCF fluorescence intensity in the erythrocytes subjected to freeze-thawing with PEG and further after CPA removal, transferred into physiological conditions *in vitro*. 1 – control (grey background of histogram); 2 – erythrocytes subjected to freeze-thawing with PEG and further after CPA removal, transferred into physiological conditions *in vitro*. The data from a typical experiment are presented.

the reason of membrane fragmentation and cell instability under physiological conditions.

The change in the content of protein band 8 in the MCC profile of erythrocytes cryopreserved in PEG presence, detected during cell incubation with no diamide use, indicated the involvement of this component in the controlling of cell stability and might be associated with activation of oxidative processes in cell. The protein band 8, identified as peroxiredoxin 2 [17], contains an easily accessible –SH group of cysteine, and is involved in cell protection against oxidative stress [15]. Therefore, after incubating the control erythrocytes with diamide, it is almost completely lost from the protein profile, by passing into HMWPC composition (Fig. 1, lane 2). The peroxiredoxin is known to be first in reacting with ROS when their production is increased, since the sensitivity of –SH group of other proteins to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is several orders lower [14]. Bearing in mind the fact, that PEG promotes the ROS production under erythrocyte incubation at pre-freezing stages [25], we may expect the inclusion of peroxiredoxin in controlling the oxidative processes in cell, thus altering its localization under metabolism reactivation in cryopreserved cells (transition from membrane-bound state to



Основним джерелом АФК в еритроцитах є спонтанне автоокислення гемоглобіну, в результаті якого формуються мет-гемоглобін (HbFe(III)) та супероксидний радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ). Останній має дуже короткий період «життя» і під впливом супероксиддисмутази швидко перетворюється на  $H_2O_2$  [14]. Перевищення критичних значень концентрації  $H_2O_2$  індукує подальше окиснення гемоглобіну [14], що призводить до його деградації [25] і втрати гема, який також може ковалентно трансформуватися [14, 25]. Модифіковане порфіринове кільце гема здатне взаємодіяти з різними субклітинними компонентами за гідрофобним механізмом, що впливає на їхній структурно-функціональний стан. Разом з тим раніше було встановлено, що заморожування еритроцитів навіть без КПА не приводить до появи мет-гемоглобіну [14]. Проте питання щодо можливості утворення мет-гемоглобіну або інших окиснених форм даного білка в кріоконсервованих із ПЕГ еритроцитах вимагає експериментальної перевірки. Таким чином, порушення конформації гемоглобіну та його автоокиснення потенційно можуть розглядатися одним із джерел утворення АФК у еритроцитах, кріоконсервованих під захистом ПЕГ.

Крім того, важливим джерелом утворення АФК в еритроцитах можуть бути NADPH оксидази (NOX). Зокрема, в серповидних еритроцитах значна частина утворення АФК опосередковується ферментативною активністю NOX [11]. Слід зазначити, що іони  $Ca^{2+}$  відіграють важливу роль у регуляції складання і функціонування NOX [17].  $Ca^{2+}$ -залежна стимуляція NOX в еритроцитах у присутності ПЕГ може бути обумовлена пригніченням активності  $Ca^{2+}$ -АТРази [4] і підвищенням рівня внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$ , оскільки, навіть в ізотонічному середовищі, що містить ПЕГ, відзначалося 10-разове збільшення входу  $Ca^{2+}$  в еритроцити [15]. Відтак,  $Ca^{2+}$ -залежний механізм утворення АФК, пов'язаний з активацією NOX, може істотно впливати на інтенсифікацію окиснювальних процесів в еритроцитах у присутності ПЕГ.

Таким чином, відсутність значних відхилень інтенсивності утворення АФК у кріоконсервованих із ПЕГ еритроцитах у фізіологічних умовах *in vitro* відносно контрольних показників протягом короткочасного спостереження свідчить про здатність клітин, які зберегли цілісність після видалення КПА, досить ефективно контролювати окиснювальні процеси. Однак на підставі раніше встановлених фактів інтенсифі-

the cytosol). As a result of these processes, the protein band 8 is not detected in MCC electrophoretic profile of erythrocytes frozen with PEG after CPA removal (Fig. 1, lane 3). Thus, the cell damage during freeze-thawing is obviously induced not only by a direct disorder of spatial-conformational state of MCC proteins under the impact of extreme environmental factors, but also by secondary changes in proteins, associated with oxidative stress development.

The ROS production, detected by DCFH<sub>2</sub>-DA reagent, characterizes the potential of oxidative process development in cells, since it displays an actual level of oxidative radical production. After penetration into a cell, the reagent de-esterifies, by remaining a non-fluorescent compound (DCFH<sub>2</sub>) until it is oxidized by ROS and transformed into DCF. Thus, an increase in DCF fluorescence, characterized by the median value of distribution histograms, reflects an increase in ROS production in cell.

Determination of DCF fluorescence level in the erythrocytes cryopreserved with PEG when transferring them into Ringer's solution after CPA removal showed the median of distribution histograms to decrease relative to the control from ( $25.9 \pm 3.1$ ) to ( $18.5 \pm 2.8$ ) arb. units;  $p < 0.05$ ,  $n = 4$  (Fig. 2, Histogram 2). Such a shift may be resulted from changes in subpopulation composition of erythrocyte suspension caused by hemolysis, *i. e.* cell death with pronounced damages to the membrane during CPA removal. Of note is the fact, that the presented findings characterize the ROS production in cryopreserved erythrocytes during a short-term observation (an hour) only, which does not exclude further changes in the studied parameter. The delayed effects of extreme freeze-thawing factors on ROS production in the erythrocytes, cryopreserved with glycerol and PEG after their hypothermic storage, were evaluated previously [25]. The erythrocytes cryopreserved with PEG, even after CPA removal displayed an increased ROS production if compared with the control samples and cells frozen with glycerol [25].

The main source of ROS in erythrocytes is a spontaneous autoxidation of hemoglobin, resulting in methemoglobin (HbFe(III)) and superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) production. The latter has a very short 'lifespan' and is rapidly converted into  $H_2O_2$  under the superoxide dismutase effect [10]. The exceeding of critical values of  $H_2O_2$  concentration induces further hemoglobin oxidation [10], resulting in its degradation [21] and heme loss, which may be covalently transformed as well [10, 21]. The modified heme porphyrin ring is able to interact with different subcellular components through a hydro-



кації утворення АФК у період інкубації еритроцитів з КПА та підвищення рівня АФК у клітинах після гіпотермічного зберігання протягом 18 годин [5], можна вважати, що окиснювальні процеси викликають дезорганізацію структурних компонентів МЦК і нестабільність кріоконсервованих клітин після повернення у фізіологічні умови *in vitro*. Отже, одним з шляхів стабілізації еритроцитів, кріоконсервованих з ПЕГ, може бути включення антиоксидантів до складу захисного середовища.

### Висновки

1. Електрофоретичний аналіз білків із застосуванням  $\beta$ -меркаптоетанолу показав зниження вмісту спектрину в білковому профілі МЦК еритроцитів, кріоконсервованих із ПЕГ, після видалення КПА та їх перенесення у фізіологічні умови *in vitro*. Використання діаміду виявило структурні модифікації спектрину, які підвищують доступність його  $-SH$ -груп для реагенту і визначають підвищення рівня ВПК відносно контролю. Відтак, порушення стабільності кріоконсервованих із ПЕГ клітин після реактивації метаболізму може бути пов'язано зі змінами в структурі спектрину.

2. Результати електрофоретичного аналізу з використанням  $\beta$ -меркаптоетанолу показали зниження вмісту білка смуги 8 (пероксиредоксину) в профілі МЦК еритроцитів, кріоконсервованих у присутності ПЕГ, після видалення КПА та їх перенесення у фізіологічні умови *in vitro*, що може бути пов'язано з активацією окиснювальних процесів у клітинах.

3. Відсутність значних змін в інтенсивності утворення АФК у кріоконсервованих із ПЕГ еритроцитах після видалення КПА і перенесення клітин в фізіологічні умови *in vitro* відносно контрольних показників свідчить про здатність клітин контролювати окиснювальні процеси протягом короткочасної інкубації.

### Література

1. An X, Gauthier E, Zhang X, et al. Adhesive activity of Lu glycoproteins is regulated by interaction with spectrin. *Blood*. 2008; 112(13): 5212–8.
2. An X, Guo X, Zhang X, et al. Conformational stabilities of the structural repeats of erythroid spectrin and their functional implications. *J Biol Chem*. 2006; 281(15): 10527–32.

phobic mechanism [10, 21], thereby affecting their structural and functional state. At the same time, as previously established, the erythrocyte freezing even without CPA use resulted in no methemoglobin appearance [10].

However, the question about a possible formation of either methemoglobin or other oxidized forms of this protein in the erythrocytes cryopreserved with PEG should be tested experimentally. Thus, the conformational disorder of hemoglobin and its autooxidation may be potentially considered as one of the sources of ROS production in the erythrocytes cryopreserved with PEG.

In addition, NADPH oxidases (NOX) may be an important source of ROS production in erythrocytes. In particular, in sickle erythrocytes, a significant part of ROS production is mediated by NOX enzymatic activity [7]. Notably, that  $Ca^{2+}$  ions play an important role in regulating NOX assembly and functioning [13]. The  $Ca^{2+}$ -dependent NOX stimulation in the erythrocytes in PEG presence may be stipulated by inhibition of  $Ca^{2+}$ -ATPase activity [24] and increase in intracellular  $Ca^{2+}$  level, since even in PEG-contained isotonic medium, a 10-fold increase in  $Ca^{2+}$  entry in erythrocytes was revealed [11]. Therefore, the  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism of ROS production, associated with NOX activation may significantly affect the intensification of oxidative processes in erythrocytes in PEG presence.

Thus, the absence of significant deviations in ROS production intensity in the erythrocytes cryopreserved with PEG under physiological conditions *in vitro* vs. the control indices within a short-term observation testifies to the ability of cells, preserving their integrity after CPA removal to control oxidative processes in a quite efficient way. However, based on previously established facts of ROS production intensification during erythrocyte incubation with CPA and an increased level of ROS in cells after hypothermic storage for 18 hrs [25], the oxidative processes may be suggested to promote the disorganization of MCC structural components and instability of cryopreserved cells after returning to physiological conditions *in vitro*. Thus, the inclusion of antioxidants within the protective medium may be one of the ways to stabilize the erythrocytes cryopreserved with PEG.

### Conclusions

1. Electrophoretic analysis of proteins using  $\beta$ -mercaptoethanol showed a decreased spectrin content in MCC protein profile of the erythrocytes, cryopreserved with PEG after CPA removal and cell transfer into physiological conditions *in vitro*. The use of diamide revealed structural modifications



3. Babijchuk LA, Zemlianskykh NG. Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO-1500. *Problems of Cryobiology*. 2001; (1): 35–41.
4. Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*. 2001; 81(3): 135–92.
5. Fairbanks G, Steck TL, Wallach D. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 1971; 10(13): 2606–17.
6. Falko OV, Zemlianskykh NG, Lipina OV, Prokopyuk OS. *Biochemistry. Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2012; 6(2): 194–202.
7. George A, Pushkaran S, Konstantinidis DG, et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood*. 2013; 121(11): 2099–107.
8. Haest CW, Kamp D, Plasa G, Deuticke B. Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by  $-SH$ -oxidizing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 469(2): 226–30.
9. Henkelman S, Noorman F, Badloe JF, Lagerberg JW. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. *Vox Sang*. 2015; 108(2): 103–12.
10. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J*. 2010; 277(2): 343–56.
11. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of  $Ca^{2+}$  influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh*. 2006; 78(6): 46–52.
12. Lux IV Samuel E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016; 127(2): 187–99.
13. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12(1): 5–23.
14. Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, et al. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J Biol Chem*. 2013; 288(20): 14170–7.
15. Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. *Mol Cells*. 2016; 39(1): 1–5.
16. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev*. 2005; 19(2): 127–42.
17. Sharma S, Punjabi V, Zingde SM, Gokhale SM. A comparative protein profile of mammalian erythrocyte membranes identified by mass spectrometry. *J Membr Biol* 2014; 247(11): 1181–9.
18. Sies H. Role of metabolic  $H_2O_2$  generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2014; 289(13): 8735–41.
19. Singbartl K, Langer R, Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes. *Cryobiology*. 1998; 36(2): 115–23.
20. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, et al. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry*. 2004; 62(2): 107–13.
21. Welbourn EM, Wilson MT, Yusof A, et al. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic Biol Med*. 2017; 103: 95–106.
22. Zemlianskykh NG. Regulation of the asymmetric distribution of lipids in human erythrocyte membrane in the presence of glycerol and polyethylene glycol. *Cell Tiss Biol*. 2020; 14(4): 286–93.
23. Zemlianskykh NG. [The effect of cryoprotective agents on proteins of the erythrocyte membrane-cytoskeleton complex]. *Biomed Khim*. 2020; 66(6): 456–63. Russian.

of spectrin, augmenting the availability of its  $-SH$ -groups for the reagent and determining an increase in HMWPC level relative to the control. Therefore, the instability of cells cryopreserved with PEG after metabolism reactivation may be due to the changes in spectrin structure.

2. Results of electrophoretic analysis using  $\beta$ -mercaptoethanol displayed a decrease in the content of protein band 8 (peroxiredoxin) in MCC profile of erythrocytes cryopreserved in PEG presence after CPA removal and cell transfer into physiological conditions *in vitro*, that might be associated with activation of oxidative processes in cells.

3. No significant changes in ROS production intensity in the erythrocytes cryopreserved with PEG after CPA removal and cell transfer into physiological conditions *in vitro* vs. the control indices testified to the ability of cells to control the oxidative processes during short-term incubation.

## References

1. An X, Gauthier E, Zhang X, Guo X, Anstee DJ, Mohandas N, Chasis JA. Adhesive activity of Lu glycoproteins is regulated by interaction with spectrin. *Blood*. 2008; 112(13): 5212–8.
2. An X, Guo X, Zhang X, Baines AJ, Debnath G, Moyo D, Salomao M, Bhasin N, Johnson C, Discher D, Gratzer WB, Mohandas N. Conformational stabilities of the structural repeats of erythroid spectrin and their functional implications. *J Biol Chem*. 2006; 281(15): 10527–32.
3. Babijchuk LA, Zemlianskykh NG. Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO-1500. *Problems of Cryobiology*. 2001; (1): 35–41.
4. Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*. 2001; 81(3): 135–92.
5. Fairbanks G, Steck TL, Wallach D. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 1971; 10(13): 2606–17.
6. Falko OV, Zemlianskykh NG, Lipina OV, Prokopyuk OS. Modification of placental blood serum proteins induced by low temperatures. *Biochemistry Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2012; 6(2): 194–202.
7. George A, Pushkaran S, Konstantinidis DG, et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood*. 2013; 121(11): 2099–107.
8. Haest CW, Kamp D, Plasa G, Deuticke B. Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by  $-SH$ -oxidizing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 469(2): 226–30.
9. Henkelman S, Noorman F, Badloe JF, Lagerberg JW. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. *Vox Sang*. 2015; 108(2): 103–12.
10. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J*. 2010; 277(2): 343–56.
11. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of  $Ca^{2+}$  influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh*. 2006; 78(6): 46–52.



24. Zemlianskykh NG, Babiychuk LA. The changes in erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity induced by PEG-1500 and low temperatures. *Cell Tiss Biol.* 2017; 11(2): 104–10.
25. Zemlianskykh NG, Babiychuk LA. The production of reactive oxygen species in human erythrocytes during cryopreservation with glycerol and polyethylene glycol. *Biophysics.* 2019; 64(4): 560–7.
12. Lux IV Samuel E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood.* 2016; 127(2): 187–99.
13. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol.* 2015; 12(1): 5–23.
14. Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, et al. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J Biol Chem.* 2013; 288(20): 14170–7.
15. Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016; 39(1): 1–5.
16. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev.* 2005; 19(2): 127–42.
17. Sharma S, Punjabi V, Zingde SM, Gokhale SM. A comparative protein profile of mammalian erythrocyte membranes identified by mass spectrometry. *J Membr Biol* 2014; 247(11): 1181–9.
18. Sies H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* 2014; 289(13): 8735–41.
19. Singbartl K, Langer R, Henrich A. Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes. *Cryobiology.* 1998; 36(2): 115–23.
20. Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, et al. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2004; 62(2): 107–13.
21. Welbourn EM, Wilson MT, Yusof A, et al. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic Biol Med.* 2017; 103: 95–106.
22. Zemlianskykh NG. Regulation of the asymmetric distribution of lipids in human erythrocyte membrane in the presence of glycerol and polyethylene glycol. *Cell Tiss Biol.* 2020; 14(4): 286–93.
23. Zemlianskykh NG. [The effect of cryoprotective agents on proteins of the erythrocyte membrane-cytoskeleton complex]. *Biomed Khim.* 2020; 66(6): 456–63. Russian.
24. Zemlianskykh NG, Babiychuk LA. The changes in erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity induced by PEG-1500 and low temperatures. *Cell Tiss Biol.* 2017; 11(2): 104–10.
25. Zemlianskykh NG, Babiychuk LA. The production of reactive oxygen species in human erythrocytes during cryopreservation with glycerol and polyethylene glycol. *Biophysics.* 2019; 64(4): 560–7.

