

УДК 57.043:612.111:547.42

Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ\*, П.М. ЗУБОВ, Л.А. БАБИЙЧУК

## Изменения белкового состава в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500

UDC 57.043:612.111:547.42

N.G. ZEMLYANSKIKH\*, P.M. ZUBOV, L.A. BABIICHUK

## Changes of Protein Composition in Membrane-Skeleton Complex of Erythrocytes Cryopreserved Under PEO-1500 Protection

При изучении модификации белкового состава мембрано-цитоскелетного комплекса (МЦК) эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, установлено изменение относительного содержания б. п. 3, анкирина, б. п. 4.1, б. п. 4.2 и б. п. 4.9 в растворах с высокой ионной силой и варьирующим содержанием двухвалентных катионов. Отмечено, что изменения МЦК в эритроцитах, криоконсервированных с ПЭО-1500 и замороженных без применения криопротекторов, характеризуются некоторыми общими чертами, что может быть обусловлено отсутствием внутри клеток веществ, стабилизирующих структуру белков при низких температурах. Изменения в МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, могут быть частично обратимы при переносе клеток в физиологические условия.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, ПЭО-1500, мембрано-цитоскелетный комплекс эритроцитов.

При вивченні модифікації білкового складу мембрано-цитоскелетного комплексу (МЦК) еритроцитів, криоконсервованих під захистом ПЕО-1500, встановлена зміна відносного вмісту б. с. 3, анкірину, б. с. 4.1, б. с. 4.2 та б. с. 4.9 у розчинах з високою іонною силою та змінним вмістом двовалентних катіонів. Встановлено, що зміни МЦК у еритроцитах, криоконсервованих з ПЕО-1500 та заморожених без використання криопротекторів, характеризуються деякими спільними рисами. Це може бути зумовлено відсутністю усередині клітин речовин, що стабілізують структуру білків при низьких температурах. Зміни в МЦК еритроцитів, криоконсервованих під захистом ПЕО-1500, можуть бути частково оборотними при перенесенні клітин до фізіологічних умов.

**Ключові слова:** криоконсервування, ПЕО-1500, мембрано-цитоскелетний комплекс еритроцитів.

When investigating the modification of protein composition of membrane-cytoskeleton complex (MCC) of the erythrocytes cryopreserved under PEO-1500 protection the change of relative content of band 3 protein, ankyrin, protein 4.2 and protein 4.9 in the solutions with high ionic strength and variation of the content of bivalent cations was found. It has been noted that MCC changes in the erythrocytes cryopreserved with PEO-1500 and frozen with no use of cryoprotectants are characterized with some common features. This may be stipulated by the absence inside cells of the substances stabilizing the protein structure at low temperatures. Alterations in MCC of erythrocytes cryopreserved with PEO-1500 protection may be partially reversible if the cells are transferred into physiological conditions.

**Key-words:** cryopreservation, PEO-1500, membrane-cytoskeletal complex of erythrocytes.

Действие низких температур на биологические объекты приводит к существенным нарушениям структуры плазматических мембран и гибели клеток [1]. Использование криопротекторов предотвращает развитие многих негативных процессов в клетках при замораживании-отогреве [7]. Криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭО-1500 обеспечивает их высокую сохранность после размораживания [2]. Мембрано-цитоскелетный комплекс (МЦК) играет важную роль в поддержании структурных и функциональных свойств данного типа клеток [5, 6, 8]. Поэтому для более полного понимания механизмов стабилизации

Effect of low temperatures on biological objects results in significant impairments of plasma membrane structure and cell death [1]. Use of cryoprotectants prevents the development of many negative processes in cells during freeze-thawing [7]. Cryopreservation of erythrocytes under PEO-1500 protection provides their high post-thaw integrity [2]. Membrane-cytoskeletal complex (MCC) plays an important role in maintaining structural and functional properties of this cell type [5, 6, 8].

Therefore for more profound understanding of the stabilization mechanisms of biological structures to stress effects under the action of low temperatures

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38  
(057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
nina\_zemlya@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereiaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373  
3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: nina\_zemlya@mail.ru

биологических структур к стрессовым воздействиям при действии низких температур и криопротекторов необходимо изучение модификации белок-белковых взаимодействий (ББВ) в этой сложной надмолекулярной системе.

Низкие температуры существенно влияют на конформацию белков вследствие нарушения гидратных оболочек макромолекул при кристаллизации внутриклеточного содержимого [1, 3]. Потеря связанной воды, являющейся важным элементом нативной структуры, может вызвать полный или частичный анфолдинг белков. В результате таких процессов белки утрачивают специфические сайты для взаимодействия со своими партнерами, что ведет к их диссоциации от сложной белковой сети МЦК эритроцитов. Вместе с тем нарушения ББВ могут сопровождаться увеличением относительного содержания некоторых белков, фиксация которых в составе надмолекулярных структур обусловлена аномальными связями, в частности ковалентными сшивками, формирующимися при окислении SH-групп цистеина соседних макромолекул, экспонированных на близком расстоянии друг от друга [15].

В данной работе предполагалось провести сравнительное исследование МЦК эритроцитов, криоконсервированных в присутствии ПЭО-1500 с интактными клетками и эритроцитами, замороженными без применения криопротекторов. С учетом важности обратимости модификаций, происходящих под влиянием криопротектора и способствующих стабилизации клеток в условиях криоконсервирования, планировалось оценить состояние МЦК после переноса криоконсервированных клеток в физиологические условия.

Цель работы – изучение модификации белкового состава МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, в средах с высокой ионной силой и варьирующим содержанием двухвалентных катионов; оценка обратимости изменений, вызванных действием криопротектора и низких температур.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили эритроциты мужчин-доноров (группа А(II)). Эритроциты осаждали на центрифуге (ОПН-3, “Дастан”, Кыргызстан) при 3000 об/мин, плазму и лейкоциты удаляли. После этого клетки трижды отмывали 3-4 объемами среды А (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4) в аналогичном режиме центрифугирования.

Для изучения модификации белкового состава МЦК под влиянием ПЭО-1500 и температуры эритроциты подвергались замораживанию-отогреву. Перед криоконсервированием к клеткам добавляли 30%-й раствор ПЭО-1500 в соотношении 1:1 по объему, приготовленный на основе среды А, и

and cryoprotectants it is necessary to study the modification of protein-protein interactions (PPI) in this complicated supra-molecular system.

Low temperatures significantly affect the protein conformation due to the damage of hydration sheaths of macromolecules at crystallization of intracellular content [1, 3]. The loss of bound water being an important component of native structure may cause either complete or partial unfolding of proteins. As a result of these processes the proteins lose the specific sites for interaction with their partners that leads to their dissociation from a complicated protein net of erythrocyte MCC. In addition the impairments of PPI may be accompanied with an increase in relative content of some proteins, the fixation of which in a complex of supra-molecular structures is stipulated with abnormal bonds, in particular covalent cross-linking, forming during oxidation of cysteine SH-groups of adjacent macromolecules exposed at a short distance from each other [15].

This research comprises a supposed comparative study of MCC for cryopreserved with PEO-1500 erythrocytes with intact cells and the erythrocytes frozen with no cryoprotectants. Taking into account an importance of reversibility of modifications occurring under cryoprotectant effect and contributing cell stabilization under cryopreservation we also planned to estimate the MCC state after transfer of cryopreserved cells into physiological conditions.

The research aim was to investigate the modification of protein composition of MCC for the erythrocytes cryopreserved under PEO-1500 protection in the media with high ionic strength and varied content of bivalent cations; to assess the reversibility of changes caused by cryoprotectant and low temperatures.

### Materials and methods

The research objects were donor's erythrocytes of men (group A (II)). Erythrocytes were sedimentated with centrifuge (OPN-3, “Dastan”, Kyrgystan) at 3000 rot/min and buffy coat were removed. Afterwards the cells were thrice washed-out with 3-4 volumes of medium A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) with the same protocol of centrifugation.

To study the modification of protein MCC composition under PEO-1500 and temperature effects the erythrocytes were frozen-thawed. Prior to cryopreservation to the cells 30% PEO-1500 was added in 1:1 ratio (v/v) prepared with basing on medium A and incubated for 40 min at 37 and 0-4°C. Cell suspension and cryoprotectant solutions prior to mixing were levelled to corresponding temperatures.

The samples were frozen down to -196°C at rapid plunging of metal containers into liquid nitrogen, thawed at 42-44°C in water thermostated bath with constant shaking.

инкубировали в течение 40 мин при 37 и 0-4°C. Суспензии клеток и растворы криопротектора перед смешиванием были доведены до соответствующих температур.

Образцы замораживали до -196°C при быстром погружении металлических контейнеров в жидкий азот, отогревали при 42-44°C в водяной термостатируемой бане при постоянном покачивании.

После деконсервирования клетки разделили на 2 части. Одну часть осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10-15 мин, удаляли супернатант, а эритроциты использовали для получения теней, другую – использовали для оценки обратимости изменений в МЦК криоконсервированных эритроцитов при моделировании трансфузии. Для этого эритроциты переносили в среду А (1:9 по объему) с поддержанием температуры 37°C в течение одного часа. После завершения инкубационного периода эритроциты осаждали при 1500 об/мин и использовали для получения теней.

Аликвоты эритроцитов лизировали в 20 объемах сред В, С, D с различным содержанием двухвалентных катионов. Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду.

Состав среды В – 135 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 0,02% сапонина и следующие добавки: 1 – 10<sup>-6</sup> М СаСl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> М МgСl<sub>2</sub>; 2 – 10<sup>-5</sup> М СаСl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> М МgСl<sub>2</sub>; 3 – 10<sup>-3</sup> М СаСl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> М МgСl<sub>2</sub>; 4 – 2 мМ ЭДТА.

Состав среды С – 250 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 0,02% сапонина, добавки 1-4.

Состав среды D – 500 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 0,02% сапонина, добавки 1-4.

На этапе лизиса (30 мин при 0-4°C) все растворы содержали ингибитор протеаз PMSF (1 мг/мл) и дитиотреитол (ДТТ) (10 мМ). Тени эритроцитов трижды отмывали двадцатикратными объемами соответствующих растворов, не содержащих PMSF, сапонин и ДТТ, осаждали центрифугированием при 12000 g в рефрижераторной центрифуге (K-24, “VEB MLW Zentrifugenbau”, Германия). Аликвоты теней солибилизировали в sample буфере (0,05 М Трис-НСl (рН 6,8); 0,4 мг/мл NaN<sub>3</sub>; 0,003 М ЭДТА; 2% SDS; 100 мМ ДТТ; 20% глицерола; 0,01% бромфенолового синего; 0,7 мг/мл PMSF) в соотношении 1:1 по объему. Концентрация белка в пробах составляла 1-2 мг/мл.

Электрофорез солибилизованных белков теней эритроцитов проводили в вертикальных пластинах SDS-ПААГ с градиентом пористости (5-20)T4C в системе Laemmly [14]. Для окрашивания белков использовали краситель Coomassie BB G-250. Денситометрирование и анализ гелей проводили с помощью программного обеспечения GEL, статистический анализ – с применением программного пакета Statgraphics for Win 2.0. Для сравнения достоверности различий в выборках

After thawing the cells were divided into 2 parts. One part was centrifuged at 1000 rot/min for 10-15 min, supernatant was removed and erythrocytes were used for obtaining ghosts, another one was used for estimation of reversibility of changes in MCC of cryopreserved erythrocytes during transfusion simulation. With this aim erythrocytes were removed into medium A (1:9 v/v) with keeping the temperature of 37°C for an hour. After finishing the incubation period the erythrocytes were sedimentated at 1500 rot/min and used for obtaining ghosts.

Erythrocyte aliquots were lysed in 20 volumes of media B,C,D with different content of bivalent cations. To prepare all the solutions deionized water was used. Medium B comprised 135 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.02 saponin, additives: 1 – 10<sup>-6</sup> M CaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> M MgCl<sub>2</sub>; 2 – 10<sup>-5</sup> M CaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> M MgCl<sub>2</sub>; 3 – 10<sup>-3</sup> M CaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> M MgCl<sub>2</sub>; 4 – 2 mM EDTA

Medium C comprised 250 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.02% saponin, additives 1-4. Medium D contained 500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.02% saponin, additives 1-4.

At lysis stage (30 min at 0-4°C) all the solutions contained the inhibitor of proteases PMSF (1mg/ml) and dithiotreitol (DTT) (10mM). Erythrocyte ghosts were thrice washed-out with 20-fold volumes of corresponding solutions containing no PMSF, saponin and DTT, sedimentated with centrifugation at 12000g in refrigerating centrifuge (K-24, “VEB MLW Zentrifugenbau”, Germany). Aliquots of ghosts were solubilized in a sample buffer (0.05 M Tris-HCl (pH 6.8); 0.4 mg/ml NaN<sub>3</sub>; 0.003 M EDTA; 2% SDS; 100 mM DTT; 20% glycerol; 0.01% bromphenol blue; 0.7 mg/ml PMSF) in 1:1 ratio (v/v). Protein concentration in samples was 1-2 mg/ml.

Electrophoresis of solubilized proteins of erythrocyte ghosts was performed in vertical plates SDS-PAAG with porosity gradient of (5-20)T4C in Laemmly system [14]. For protein staining there was used the dye Coomassie BB G-250. Densitometry and analysis of gels were carried out using GEL software, and the statistical analysis was performed with the Statgraphics for Win 2.0 software. To reveal the statistical significance in the samples non-parametric method for paired samples, the sign test, was used.

## Results and discussion

Study of protein and erythrocyte MCC interaction modification under cryopreservation effect in PEO-1500 presence is based on the analysis of changes in protein spectrum of ghosts at the contact with the media of different ionic strength. Since a protein net is associated by weak non-covalent bonds sensitive to the changes on physical and chemical environmental factors [4, 21], behaviour of supra-molecular structure modified under the effect of cryoprotectant and low

применяли непараметрический метод, для парных выборок – критерий знаков.

### Результаты и обсуждение

Изучение модификации взаимодействия белков в МЦК эритроцитов под воздействием криоконсервирования в присутствии ПЭО-1500 основывается на анализе изменения белкового спектра теней при контакте со средами с различной ионной силой. Поскольку белковая сеть ассоциирована посредством слабых нековалентных связей, чувствительных к изменениям физико-химических факторов внешней среды [4, 21], поведение надмолекулярной структуры, модифицированной под воздействием криопротектора и низких температур, будет отличаться от реакции нативных белков на аналогичные параметры среды. Кроме повышения ионной силы растворов, для выявления особенностей модификации ББВ в МЦК эритроцитов варьировали состав двухвалентных катионов.

Как видно из данных табл. 1, в  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -содержащих средах с физиологическим уровнем ионной силы общее отличие от нативных клеток, демонстрируемое всеми группами криоконсервированных эритроцитов – снижение уровня б. п. 3. Эта тенденция обнаруживается в эритроцитах независимо от использования криопротектора в процессе замораживания-отогрева. Кроме того, в средах, не содержащих двухвалентных катионов, и в средах с низкой концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-6}$  М) отмечается увеличение содержания б. п. 4.2 и б. п. 4.9 в спектре теней криоконсервированных эритроцитов. Относительно низкий уровень  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М) позволяет выявить еще один участок модификации межбелковых взаимодействий в МЦК криоконсервированных клеток, который ассоциируется с увеличением содержания анкирина и снижением уровня б. п. 4.1, в сравнении с нативными.

Повышение концентрации соли до 250 мМ КСl в  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -содержащих средах выявляет только одну особенность модификации межбелковых взаимодействий в МЦК криоконсервированных эритроцитов – снижение содержания б. п. 3 по сравнению с контролем (табл. 2). При дальнейшем повышении концентрации солей (табл. 3) были установлены различия между МЦК нативных и криоконсервированных клеток, большинство из которых аналогичны изменениям, зафиксированным ранее в средах с физиологическим уровнем ионной силы. Прежде всего это касается уменьшения содержания б. п. 3 в клетках, подвергнутых замораживанию-отогреву независимо от присутствия ПЭО-1500 при всех вариациях состава среды ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ЭДТА). Также в аналогичных условиях отмечалось повышение относительного содержа-

температуры will differ from the reaction of native proteins under the same medium parameters. In addition to increasing ionic strength of the solutions for revealing the peculiarities of PPI modification in erythrocyte MCC the composition of bivalent cations were varied.

The data of Table 1 show that in  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -containing media with physiological level of ionic strength the general distinction for native cells, demonstrated by all groups of cryopreserved erythrocytes is a reduced level of band 3 protein. This tendency is found in erythrocytes independently on cryoprotectant use in freeze-thawing. In addition in the media non containing bivalent cations and in the media with low  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $10^{-6}$  M) there is observed an increased content of protein 4.2 and protein 4.9 in the spectrum of ghosts of cryopreserved erythrocytes. Quite low level of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M) enables the revealing in MCC of cryopreserved cells one more region with modified protein interaction which is associated with an increased content of ankyrin and reduced level of protein 4.1 with native ones.

Increased salt concentration up to 250 mM KCl in  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -containing media reveals only one peculiarity of modification of the interactions between proteins in MCC of cryopreserved erythrocytes: a decrease in the content of band 3 protein if compared with the control (Table 2). With further rise in salt concentrations (Table 3) there were established the differences between MCC of native and cryopreserved cells, the majority of which are the same as for the changes fixed earlier in the media with physiological level of ionic strength. First of all, this concerns the reduction in of the content of band 3 protein in cells subjected to freeze-thawing independently on PEO-1500 presence in all the variations of the medium composition ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , EDTA). Also under the same conditions there was noticed a rise in relative content of protein 4.2 in erythrocytes subjected to freezing under PEO-1500 protection and with no cryoprotectants. Chelating of bivalent actions revealed the modification of PPI in MCC of cryopreserved erythrocytes resulting in a rise in the content of protein 4.1 and protein 4.9.

Thus, the effect of low temperatures on human erythrocytes cause some modifications of PPI in MCC which mainly touch on band 3 protein, protein 4.2, protein 4.9 and ankyrin. Used in this research experimental approach did not reveal any significant differences in the character of protein modifications of erythrocyte MCC frozen under protection of PEO-1500 and with no cryoprotectants. Nevertheless in some cases the modifications of PPI in MCC of cells frozen with no cryoprotectant have other type of the changes in protein spectrum of compared with the parameters obtained during cryopreservation under PEO-1500 protection. So, in frozen with no cryoprotectant erythrocytes at physiological level of ionic strength



**Таблица 1.** Состав МЦК эритроцитов в среде В (135 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6): 1 – интактные клетки; 2 – эритроциты, замороженные в среде без криопротекторов; 3 – эритроциты, замороженные после инкубации с ПЭО-1500 при 0-4°C; 4 – эритроциты, замороженные после инкубации с ПЭО-1500 при 37°C.  
**Table 1.** Composition of erythrocyte MCC in the medium В (135 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6): 1 – intact cells; 2 – erythrocytes frozen in the medium with no cryoprotectants; 3 – erythrocytes frozen after incubation with PEO-1500 at 0-4°C; 4 – erythrocytes frozen after incubation with PEO-1500 at 37°C.

Дополнительные компоненты среды Additional components of medium	Группа Group	Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC										
		$\alpha$ -спектрин $\alpha$ -spectrin	$\beta$ -спектрин $\beta$ -spectrin	Ангириин Angiirin	Б. п. 3 Band 3 protein	Post б. п. 3 Post band 3 protein	Б. п. 4.1 Protein 4.1	Б. п. 4.2 Protein 4.2	Б. п. 4.9 Protein 4.9	Б. п. 5 Band 5 protein	Post б.п.5 Post band 5 protein	
$10^{-6}$ M $Ca^{2+}$ , $10^{-3}$ M $Mg^{2+}$	1	7,9 $\pm$ 0,9	11,20 $\pm$ 1,25	4,00 $\pm$ 0,34	18,0 $\pm$ 0,73	2,80 $\pm$ 0,24	4,40 $\pm$ 0,21	3,80 $\pm$ 0,13	1,60 $\pm$ 0,07	3,50 $\pm$ 0,15	1,40 $\pm$ 0,05	
	2	9,70 $\pm$ 0,54	11,90 $\pm$ 0,71	4,80 $\pm$ 0,29*	15,5 $\pm$ 0,4*	3,70 $\pm$ 0,52	3,70 $\pm$ 0,29*	5,60 $\pm$ 0,31*	1,90 $\pm$ 0,12*	2,70 $\pm$ 0,24*	1,50 $\pm$ 0,12	
	3	7,90 $\pm$ 0,26	9,30 $\pm$ 0,23	4,60 $\pm$ 0,21*	15,7 $\pm$ 1,31*	3,40 $\pm$ 0,09	3,80 $\pm$ 0,23*	4,80 $\pm$ 0,29*	2,10 $\pm$ 0,27*	3,40 $\pm$ 0,15	1,30 $\pm$ 0,15	
	4	8,30 $\pm$ 0,47	7,70 $\pm$ 0,13	4,90 $\pm$ 0,45*	13,10 $\pm$ 0,85*	4,00 $\pm$ 0,09	3,60 $\pm$ 0,49*	5,90 $\pm$ 0,22*	1,9 $\pm$ 0,12*	3,80 $\pm$ 0,12	1,50 $\pm$ 0,12	
$10^{-5}$ M $Ca^{2+}$ , $10^{-3}$ M $Mg^{2+}$	1	8,80 $\pm$ 0,6	10,50 $\pm$ 0,49	3,50 $\pm$ 0,27	16,70 $\pm$ 0,39	3,90 $\pm$ 0,23	4,60 $\pm$ 0,49	3,90 $\pm$ 0,25	1,80 $\pm$ 0,09	3,60 $\pm$ 0,28	1,30 $\pm$ 0,12	
	2	9,90 $\pm$ 0,46	12,50 $\pm$ 0,85	6,50 $\pm$ 0,41*	14,30 $\pm$ 0,84*	3,40 $\pm$ 0,18	4,00 $\pm$ 0,34	3,7 $\pm$ 0,1	1,80 $\pm$ 0,08	3,90 $\pm$ 0,35	1,60 $\pm$ 0,09	
	3	8,80 $\pm$ 0,53	11,90 $\pm$ 1,22	4,40 $\pm$ 0,59*	14,20 $\pm$ 0,95*	3,50 $\pm$ 0,25	3,80 $\pm$ 0,07	3,20 $\pm$ 0,18	1,7 $\pm$ 0,1	3,30 $\pm$ 0,19	1,70 $\pm$ 0,06*	
	4	8,90 $\pm$ 0,43	10,20 $\pm$ 0,49	4,70 $\pm$ 0,26*	13,40 $\pm$ 0,87*	2,70 $\pm$ 0,06	3,90 $\pm$ 0,17	3,90 $\pm$ 0,17	1,30 $\pm$ 0,12	3,80 $\pm$ 0,15	1,70 $\pm$ 0,03*	
$10^{-3}$ M $Ca^{2+}$ , $10^{-3}$ M $Mg^{2+}$	1	11,0 $\pm$ 3,7	8,90 $\pm$ 1,35	3,90 $\pm$ 0,15	18,10 $\pm$ 0,76	3,70 $\pm$ 0,37	4,30 $\pm$ 0,31	3,90 $\pm$ 0,26	2,00 $\pm$ 0,14	3,80 $\pm$ 0,29	1,60 $\pm$ 0,15	
	2	8,70 $\pm$ 0,71	9,50 $\pm$ 0,25	3,80 $\pm$ 0,81	13,30 $\pm$ 1,29*	4,50 $\pm$ 0,45	4,10 $\pm$ 0,35	5,30 $\pm$ 0,47	1,70 $\pm$ 0,06	3,60 $\pm$ 0,15	3,60 $\pm$ 0,15	
	3	8,20 $\pm$ 0,41	10,00 $\pm$ 0,61	3,60 $\pm$ 0,32	12,80 $\pm$ 0,85*	3,80 $\pm$ 0,23	4,30 $\pm$ 0,23	4,00 $\pm$ 0,12	1,80 $\pm$ 0,09	3,70 $\pm$ 0,07	1,70 $\pm$ 0,12	
	4	9,20 $\pm$ 0,65	10,00 $\pm$ 0,78	3,20 $\pm$ 0,57	12,9 $\pm$ 0,91*	3,60 $\pm$ 0,36	3,80 $\pm$ 0,24	4,50 $\pm$ 0,33	1,80 $\pm$ 0,17	3,3 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2	
2 mM ЭДТА 2 mM EDTA	1	8,4 $\pm$ 0,9	10,60 $\pm$ 1,25	3,80 $\pm$ 0,59	16,8 $\pm$ 1,0	–	4,00 $\pm$ 0,16	3,8 $\pm$ 0,2	1,40 $\pm$ 0,07	3,7 $\pm$ 0,3	1,40 $\pm$ 0,12	
	2	9,90 $\pm$ 0,41	11,50 $\pm$ 1,09	3,8 $\pm$ 0,4	13,8 $\pm$ 1,0*	3,5 $\pm$ 0,4	3,70 $\pm$ 0,17	4,30 $\pm$ 0,27	1,60 $\pm$ 0,06	4,30 $\pm$ 0,37	1,50 $\pm$ 0,12	
	3	8,90 $\pm$ 0,56	11,30 $\pm$ 0,95	4,20 $\pm$ 0,45	16,80 $\pm$ 0,79	2,9 $\pm$ 0,7	4,80 $\pm$ 0,24	5,70 $\pm$ 0,12*	1,90 $\pm$ 0,19	3,90 $\pm$ 0,36	1,50 $\pm$ 0,05	
	4	5,50 $\pm$ 0,68	9,90 $\pm$ 0,28	3,60 $\pm$ 0,12	13,70 $\pm$ 0,98*	3,1 $\pm$ 0,5	4,10 $\pm$ 0,15	4,30 $\pm$ 0,18*	1,80 $\pm$ 0,07	3,30 $\pm$ 0,15	0,90 $\pm$ 0,09	

**Примечание:** \* – данные отличаются от контроля с уровнем  $P < 0,05$ . Результаты представлены в процентах от общего содержания белка в виде  $M \pm SE$ .  
**Note:** \* – the data differ from the control with  $P < 0,05$ . The results are presented in percentage from total protein content as  $M \pm SE$ .

**Таблица 2.** Состав МЦК эритроцитов в среде С (250 мМ КСL, 10 мМ Трис-НСL, рН 7,6): 1 – интактные клетки; 2 – эритроциты, замороженные в среде без криопротекторов; 3 – эритроциты, замороженные после инкубации с ПЭО-1500 при 0-4°С; 4 – эритроциты, замороженные после инкубации с ПЭО-1500 при 37°С.  
**Table 2.** Composition of erythrocyte MCC in the medium С (250 mM KCL, 10 mM Tris-HCL, pH 7.6): 1 – intact cells; 2 – erythrocytes frozen in the medium with no cryoprotectants; 3 – erythrocytes frozen after incubation with PEO-1500 at 0-4°С; 4 – erythrocytes frozen after incubation with PEO-1500 at 37°С.

Дополнительные компоненты среды Additional components of medium		Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC										
Группа Group		$\alpha$ -спектрин $\alpha$ -spectrin	$\beta$ -спектрин $\beta$ -spectrin	Ангирутин Angiutin	Б. п. 3 Band 3 protein	Post б. п. 3 Post band 3 protein	Б. п. 4.1 Protein 4.1	Б. п. 4.2 Protein 4.2	Б. п. 4.9 Protein 4.9	Б. п. 5 Band 5 protein	Post б. п. 5 Post band 5 protein	
$10^{-6}$ М Ca <sup>2+</sup> , $10^{-3}$ М Mg <sup>2+</sup>	1	9,0±1,3	10,20±0,99	4,30±0,34	15,70±0,87	3,50±0,09	4,70±0,38	3,80±0,35	1,60±0,12	3,90±0,25	1,40±0,19	
	2	8,50±0,81	10,50±1,82	4,20±0,54	12,00±1,03*	3,6±0,2	3,90±0,18*	3,90±0,22	1,30±0,13	3,50±0,12	1,80±0,15*	
	3	9,50±0,81	10,00±0,94	4,40±0,54	13,2±1,6	3,30±0,06	4,50±0,26	4,60±0,41	2,00±0,09*	3,6±0,1	1,80±0,09*	
	4	8,70±1,01	8,80±0,77	3,90±0,51	12,50±0,35*	3,30±0,12	4,40±0,32	4,10±0,12	1,90±0,19*	3,30±0,12	1,70±0,13*	
$10^{-5}$ М Ca <sup>2+</sup> , $10^{-3}$ М Mg <sup>2+</sup>	1	9,8±0,9	12,00±0,66	4,40±0,31	14,80±0,42	3,4±0,1	4,40±0,13	4,50±0,34	1,50±0,11	4,10±0,31	1,70±0,15	
	2	9,30±0,38	10,80±0,74	4,70±0,46	13,50±0,41*	3,60±0,03	4,60±0,09	4,90±0,11	1,50±0,09	3,10±0,13	1,60±0,18	
	3	9,50±0,65	12,00±1,03	4,90±0,89	13,70±0,49*	3,10±0,21	4,50±0,29	4,70±0,42	2,10±0,26	3,3±0,2	1,70±0,16	
	4	7,80±1,13	9,60±1,05	4,30±0,52	14,50±0,43*	3,90±0,26	4,10±0,18	4,00±0,59	1,7±0,1	3,6±0,2	1,50±0,12	
$10^{-3}$ М Ca <sup>2+</sup> , $10^{-3}$ М Mg <sup>2+</sup>	1	9,3±0,8	10,5±0,2	4,10±0,28	16,10±1,04	3,30±0,34	4,10±0,17	5,00±0,24	1,90±0,26	3,50±0,27	2,30±0,18	
	2	8,1±0,7	10,60±1,35	3,50±0,85	13,40±0,38*	3,00±0,35	3,90±0,32	3,7±0,2	1,60±0,12	3,80±0,15	2,40±0,26	
	3	8,6±0,9	9,20±1,43	4,60±0,69	14,40±0,38*	3,10±0,21	3,80±0,29	4,30±0,26	1,60±0,12	3,4±0,1	2,00±0,09	
	4	7,90±0,84	10,00±1,32	4,90±0,6	12,20±1,39*	3,2±0,19	5,60±0,26	4,9±0,3	1,40±0,09	3,8±0,25	1,5±0,3	
2 мМ ЭАТА 2 мМ EDTA	1	10,0±0,6	12,00±0,45	4,90±0,38	16,4±0,5	–	5,1±0,2	4,10±0,21	1,70±0,23	4,00±0,24	2,00±0,19	
	2	9,60±0,83	10,5±1,2	5,70±0,68	13,40±0,75	–	5,40±0,39	4,30±0,28	1,60±0,14	3,80±0,19	2,00±0,13	
	3	10,60±0,93	12,30±0,59	5,10±0,94	14,90±0,34*	–	4,60±0,46	4,20±0,35	1,6±0,1	4,5±0,2	1,5±0,1	
	4	8,30±1,27	9,90±1,82	4,10±0,9	14,00±1,33*	–	5,60±0,19	5,20±0,19	1,60±0,06	3,60±0,19	1,3±0,2	

**Примечание:** \* – данные отличаются от контроля с уровнем P<0,05. Результаты представлены в процентах от общего содержания белка в виде M±SE.  
**Note:** \* – the data differ from the control with P<0.05. The results are presented in percentage from total protein content as M±SE.

**Таблица 3.** Состав МЦК эритроцитов в среде D (500 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6): 1 – интактные клетки; 2 – эритроциты, замороженные в среде без криопротекторов; 3 – эритроциты, замороженные после инкубирования с ПЭО-1500 при 0-4°C; 4 – эритроциты, замороженные после инкубирования с ПЭО-1500 при 37°C.

**Table 3.** Composition of erythrocyte MCC in the medium D (500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6): 1 – intact cells; 2 – erythrocytes frozen in the medium with no cryoprotectants; 3 – erythrocytes frozen after incubation with PEO-1500 at 0-4°C; 4 – erythrocytes frozen after incubation with PEO-1500 at 37°C.

Дополнительные компоненты среды Additional components of medium		Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC										
		Группа Group	$\alpha$ -спектрин $\alpha$ -spectrin	$\beta$ -спектрин $\beta$ -spectrin	Анкирин Ankyrin	Б. п. 3 Band 3 protein	Post б. п. 3 Post band 3 protein	Б. п. 4.1 Protein 4.1	Б. п. 4.2 Protein 4.2	Б. п. 4.9 Protein 4.9	Б. п. 5 Band 5 protein	Post б.п.5 Post band 5 protein
$10^{-6}$ М Ca <sup>2+</sup> , $10^{-3}$ М Mg <sup>2+</sup>	1	8,1±0,8	12,20±0,71	4,60±0,15	15,1±0,36	3,30±0,18	4,10±0,35	5,50±0,13	1,6±0,1	3,7±0,2	1,50±0,08	
	2	7,30±1,13	9,10±0,81	3,6±0,2*	13,6±0,33*	3,20±0,25	5,90±0,33	6,10±0,09	1,60±0,09	3,40±0,26	1,90±0,03	
	3	6,90±0,57	9,3±0,8	4,3±0,1	13,7±0,46*	3,30±0,24	4,90±0,41	8,60±0,29*	1,60±0,06	3,00±0,15	2,00±0,12	
	4	6,60±0,82	12,00±0,98	5,00±0,35	12,1±1,03*	5,40±0,29	4,50±0,15	6,60±0,15*	1,80±0,07	2,90±0,18	2,00±0,09	
$10^{-5}$ М Ca <sup>2+</sup> , $10^{-3}$ М Mg <sup>2+</sup>	1	7,3±0,8	11,40±0,42	2,90±0,27	14,8±0,89	3,40±0,36	3,60±0,18	5,80±0,55	2,2±0,2	4,30±0,43	2,80±0,29	
	2	4,70±0,55	9,50±0,18	3,70±0,15	10,40±0,74*	5,20±0,2	3,50±0,07	8,00±0,23*	1,80±0,15	4,00±0,06	2,60±0,07	
	3	5,60±0,36	8,30±0,81	2,7±0,3	10,90±0,46*	3,80±0,24	4,30±0,26	8,1±0,2*	1,80±0,15	3,60±0,18	2,40±0,07	
	4	5,80±0,67	7,9±0,92	–	10,90±0,18*	5,00±0,18	4,3±0,2	8,20±0,38*	2,10±0,15	3,80±0,15	2,50±0,12	
$10^{-3}$ М Ca <sup>2+</sup> , $10^{-3}$ М Mg <sup>2+</sup>	1	7,7±0,6	10,60±0,69	3,7±0,23	13,70±0,54	3,30±0,15	4,80±0,43	4,80±0,39	2,00±0,14	4,00±0,3	2,80±0,14	
	2	5,9±0,6	8,70±0,95	–	11,20±0,62*	4,00±0,27	4,30±0,19	8,30±0,42*	1,70±0,23	4,00±0,15	1,60±0,15	
	3	5,70±1,13	8,10±0,93	–	12,10±0,55*	4,40±0,24	4,50±0,21	7,9±0,2*	1,20±0,18	4,00±0,19	1,50±0,17	
	4	6,70±1,04	7,20±1,13	–	12,40±0,81*	3,90±0,32	4,90±0,23	8,4±0,64*	1,90±0,06	3,90±0,32	2,20±0,12	
2 мМ ЭДАТА 2 mM EDTA	1	7,3±0,6	10,10±0,34	3,2±0,29	14,90±0,58	–	4,80±0,14	5,9±0,22	1,8±0,2	4,30±0,44	2,7±0,08	
	2	5,80±0,85	8,50±0,71	–	12,10±0,06*	3,90±0,12	7,10±0,32*	7,60±0,35*	2,60±0,09*	4,10±0,21	2,20±0,19*	
	3	5,50±0,58	6,20±0,32	–	11,50±0,57*	3,7±0,00	5,60±0,47*	7,00±0,46*	2,7±0,1*	4,30±0,12	3,00±0,03*	
	4	6,20±0,28	7,50±0,23	–	12,20±0,85*	4,2±0,00	6,30±0,38*	6,60±0,17*	2,80±0,15*	4,00±0,22	3,00±0,15*	

**Примечание:** \* – данные отличаются от контроля с уровнем P<0,05. Результаты представлены в процентах от общего содержания белка в виде M±SE.

**Note:** \* – the data do not differ from the control with P<0.05. The results are presented in percentage from total protein content as M±SE.

ния б. п. 4.2 в эритроцитах, подвергнутых замораживанию под защитой ПЭО-1500 и без криопротекторов. Хелатирование двухвалентных катионов выявило модификацию ББВ в МЦК криоконсервированных эритроцитов, которая приводит к повышению содержания б. п. 4.1 и б. п. 4.9.

Таким образом, действие низких температур на эритроциты человека вызывает ряд модификаций ББВ в МЦК, которые затрагивают главным образом б. п. 3, б. п. 4.2, б. п. 4.9 и анкирин. Используемый в работе экспериментальный подход не выявил каких-либо существенных отличий в характере модификации белков МЦК эритроцитов, замороженных под защитой ПЭО-1500 и при отсутствии криопротекторов. Тем не менее в ряде случаев модификации ББВ в МЦК клеток, замороженных без криопротектора, имеют иной тип изменений в белковом спектре по сравнению с характеристиками, полученными при криоконсервировании клеток под защитой ПЭО-1500. Так, в замороженных без криопротектора эритроцитах при физиологическом уровне ионной силы и содержании  $\text{Ca}^{2+}$  в среде  $10^{-6}$  М отмечается снижение уровня актина (б. п. 5). В среде, содержащей 250 мМ КСl, при такой же концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдается падение уровня б. п. 4.1, а в среде 500 мМ КСl в присутствии ЭДТА содержание белка в зоне post б. п. 5 снижается, в отличие от клеток, криоконсервированных с ПЭО-1500. Сходство модификаций ББВ в МЦК эритроцитов при их замораживании без криопротекторов и под защитой ПЭО-1500 может быть связано с нарушением структуры макромолекул в процессе кристаллизации внутриклеточного раствора и концентрирования солей. Поскольку ПЭО-1500 не проникает в клетки, белки МЦК оказываются в среде с высокой концентрацией солей при отсутствии веществ, способных стабилизировать структуру воды гидратных оболочек в пограничных зонах макромолекул при низких температурах. Подобные закономерности наблюдаются при замораживании клеток без криопротекторов. Несмотря на то, что эритроциты, замороженные под защитой ПЭО-1500, сохраняют целостность, отмечаются структурные изменения белков в МЦК. Функциональное изменение в МЦК эритроцитов на молекулярном уровне при этих условиях, очевидно, во многом определяет дальнейшее поведение клеток.

Анализируя полученные результаты, можно высказать некоторые предположения относительно причин и последствий модификации ББВ, ведущих к изменениям белкового спектра в ПААГ. Так, уменьшение б.п.3 может быть обусловлено двумя процессами: везикуляцией мембраны и/или расщеплением белка протеазами. Под влиянием ПЭО-1500 или физико-химических факторов

and  $\text{Ca}^{2+}$  content in the medium of  $10^{-6}$  M the reduction of actin level is noticed (band 5 protein). In the medium containing 250 mM KCl at the same concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ , the fall in the level of band 4.1 protein is observed and in 500 mM KCl in EDTA presence the protein content in the zone of post band 5 protein reduces in contrast to cells cryopreserved with PEO-1500. Similarity of PPI modifications in MCC of erythrocytes at their freezing with no cryoprotectants and under PEO-1500 protection may be related to the impairment of macromolecule structure during crystallization of intracellular solution and salt concentrating. Since PEO-1500 does not penetrate into cells, the MCC proteins are turned out to be in the medium of high salt concentrations at the absence of the substances capable of stabilizing the water structure of hydrate shells in boundary zones of macromolecules under low temperatures. Similar regularities are observed during freezing of cells with no cryoprotectants. In spite of erythrocytes frozen under PEO-1500 protection preserve integrity, structural changes of proteins in MCC are noted. Functional alterations at molecular level in erythrocyte MCC under these conditions likely determine further behaviour of cells.

When analyzing the obtained result it may be suggested as for the causes and consequences of PPI modifications, leading to the change in protein spectrum in PAAG. So, the decrease in band 3 protein may be stipulated by two processes: membrane vesiculation and/or its proteolysis by proteases. Under the effect of either PEO-1500 or physical and chemical environmental factors accompanying to freeze-thawing membrane dehydration can be observed that affects the dynamics of associations in ordered system of lipid bilayer and integral proteins. These processes may be accompanied with membrane vesiculation and loss of main erythrocyte membrane protein: band 3 protein. These changes are likely characteristic primarily for band 3 molecules not associated with cytoskeleton. The loss of integral proteins may result in a reduced resistance of membrane, since the functions of integral proteins in maintaining of membrane stability are determined by their capability to bind and stabilize the lipids as well as regulate a local flexion of membrane [20]. Decrease in relative content of band 3 protein may be also the result of its partial cleavage by  $\text{Ca}^{2+}$ -activated proteases that should be accompanied with a rise in the protein content with slightly lower molecular weight in the zone of post and 3. Though no statistically significant differences in the content of post band 3 were found these two processes by adding each other may likely take place in frozen-thawed erythrocytes.

The role of protein 4.2 which level increases after low temperature effect, has been slightly studied till now [13]. It has been established that this protein is mandatory component of the macrocomplex structure



среды, сопутствующих замораживанию-отогреву, может наблюдаться дегидратация мембраны, что влияет на динамику связей в упорядоченной системе липидного бислоя и интегральных белков. Такие процессы могут сопровождаться везикуляцией мембраны и потерей основного мембранного белка эритроцитов – б. п. 3. Очевидно, данные изменения характерны, в первую очередь, для молекул б. п. 3, которые не связаны с цитоскелетом. Потеря интегральных белков может привести к снижению устойчивости мембраны, поскольку функции интегральных белков в поддержании мембранной стабильности определяются, в частности, их способностью связывать и стабилизировать липиды, а также регулировать локальную кривизну мембраны [20]. Снижение относительного содержания б. п. 3 может быть также результатом его частичного расщепления  $Ca^{2+}$ -активируемыми протеазами, что должно было бы сопровождаться увеличением содержания белка с несколько меньшим молекулярным весом в зоне post band 3. Хотя достоверных отличий в содержании post band 3 в интактных и криоконсервированных клетках не отмечалось, возможно, оба процесса, дополняя друг друга, могут происходить в эритроцитах, подвергнутых замораживанию-отогреву.

Роль б. п. 4.2, уровень которого повышается после низкотемпературного воздействия, до настоящего времени мало изучена [13]. Установлено, что данный белок – обязательный компонент структуры макрокомплекса с участием рhesus-фактора: RhAG (Rh-ассоциированный гликопротеин) – CD47-белок 4.2 и/или анкирин [11, 16]. Эта сложная белковая ассоциация опосредует связь цитоскелетной сети с мембраной. Еще одной возможностью опосредованных вертикальных контактов через б. п. 4.2 может быть связь данного белка со спектрином и липидным бислоем. Известно, что б. п. 4.2 подвергается меристелированию [17]. Ковалентное включение ацильного остатка в состав данного белка может облегчать его связь с липидным бислоем. Можно предположить, что вертикальные контакты в МЦК эритроцитов под влиянием ПЭО-1500 усиливаются различными путями, в том числе через опосредование связи мембрана-цитоскелет с участием анкирина и б. п. 4.2 [18]. Подобные закономерности могут проследиваться и в отношении б. п. 4.1. Следствием более жестких контактов между белками-партнерами может быть увеличение механической прочности клеток [12] и связанное с этим повышение стабильности эритроцитов к действию факторов криоконсервирования.

Криоконсервирование эритроцитов продемонстрировало возможность модификации ББВ в

with the participation of rhesus factor: RhAG (Rh-associated glycoprotein) – CD 47-protein 4.2 and /or ankyrin [11, 16]. This complicated protein association mediates the bond of cytoskeleton net with a membrane. One more possibility of mediated vertical contacts via protein 4.2 may be the association of this protein with spectrin and lipid bilayer. It is known that protein 4.2 is subjected to myristilation [17]. Covalent inclusion of acyl residue into the composition of this protein may facilitate its bond with lipid bilayer. One may suppose that vertical contacts in erythrocyte MCC under PEO-1500 effect are strengthened by different ways, including via mediated bonds of membrane-cytoskeleton with ankyrin participation and band 4.2 protein [18]. Similar regularities may be traced in respect of protein 4.1. The consequence of more rigid contacts between partner proteins may be an increased cell mechanical resistance [12] and associated with this rise in the stability of erythrocytes to the effect of cryopreservation factors.

Cryopreservation of erythrocytes demonstrated the possibility of PPI modification in MCC structure related to the change in the content of protein 4.9. In the zone of protein 4.9 with the application of immune blotting there were revealed 2 cytoskeletal proteins (tropomodulin and dematin) which under different positions are localized on actin protofilaments [10, 19] and contribute to stabilization of their structure. It may be supposed that changes in MCC spectrum of cryopreserved erythrocytes reflect the formation of more rigid structure of junction complexes of cytoskeletal net.

Temperature conditions of cell incubation with PEO-1500 do not evidently and strongly affect the character of modification of protein-protein interactions. Only in the solutions with physiological level of ionic strength in EDTA presence and the medium, containing 250 mM KCl ( $10^{-5}$  M  $Ca^{2+}$ ) there were no statistically significant changes in the content of band 3 protein in cryopreserved erythrocytes pre-incubated with PEO-1500 at 0-4°C.

Changes in the structure of MCC of the erythrocytes cryopreserved with PEO-1500 protection may significantly affect the cell viability. To estimate the reversibility of these changes after cell coming back to physiological conditions the experiments on transfusion simulation were done. It has been established that under these conditions about 20-30% of cells may die. Herewith subpopulation composition of erythrocytes after transfusion simulation may differ from the cell spectrum in thawed suspension. The state of MCC of erythrocytes preserved the structure integrity after turning back into physiological conditions may apparently reflect the changes stipulated with structural rearrangements of proteins in frozen-thawed erythrocytes and the alterations of subpopulation composition of cells involved into the analysis. In table 4 the densi-

структуре МЦК, связанную с изменением содержания б. п. 4.9. В зоне б. п. 4.9 с применением иммуноблотинга было выявлено 2 цитоскелетных белка (тропомодулин и дематин), которые в различных позициях локализованы на актиновых протофиламентах [10, 19] и способствуют стабилизации их структуры. Можно предположить, что изменения в спектре МЦК криоконсервированных эритроцитов отражают формирование более жесткой структуры узловых комплексов цитоскелетной сети.

Температурные условия инкубирования клеток с ПЭО-1500, очевидно, не оказывают заметного влияния на характер модификации белок-белковых взаимодействий. Только в растворе с физиологическим уровнем ионной силы в присутствии ЭДТА и среде, содержащей 250 мМ KCl ( $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$ ), отсутствовали достоверно значимые изменения содержания б. п. 3 в криоконсервированных эритроцитах, преинкубированных с ПЭО-1500 при 0-4°C.

Изменения в структуре МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, могут существенно повлиять на жизнеспособность клеток. Для оценки обратимости этих изменений после возврата клеток в физиологические условия были проведены эксперименты по моделированию трансфузии. Установлено, что в этих условиях может погибать около 20-30% клеток. В связи с этим субпопуляционный состав эритроцитов после моделирования трансфузии, по-видимому, значительно отличается от спектра клеток в размороженной суспензии. Состояние МЦК эритроцитов, сохранивших целостность структуры после возвращения в физиологические условия, может отражать изменения, обусловленные структурными перестройками белков в деконсервированных эритроцитах, и изменения субпопуляционного состава клеток, вовлеченных в анализ. В табл. 4 представлены данные денситометрии белкового спектра теней криоконсервированных эритроцитов после моделирования трансфузии. Основное отличие криоконсервированных эритроцитов от нативных клеток, связанное со снижением б. п. 3, не обнаружено в клетках после трансфузии. По-видимому, клетки, определявшие эту особенность белкового спектра МЦК размороженных эритроцитов, отличаются значительной нестабильностью и гибнут при переносе в физиологические условия. Вместе с тем некоторые общие черты, характеризующие структуру белков в клетках после размораживания и трансфузии, все же можно констатировать. Это касается повышения по сравнению с нормой содержания б. п. 4.9 в среде с физиологическим уровнем ионной силы (в присутствии как  $Ca^{2+}$ , так и ЭДТА), а также анкирина (135 мМ KCl,  $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$ ). Противоположные тенденции отмечены в отношении б. п. 4.2, уровень которого в МЦК

tometry data for protein spectrum of the ghosts of cryopreserved erythrocytes after transfusion simulation are given.

The main distinction of frozen-thawed erythrocytes from native cells related to a reduction of band 3 protein was not revealed in cells after transfusion. The cells determining this peculiarity of protein spectrum of MCC of thawed erythrocytes are probably notable for significant instability and dye when being transferred into physiological conditions. Along with this some general features characterizing protein structure in cells after thawing and "transfusion" anyway can be stated. This concerns an increase of protein 4.9 if compared with the norm in the medium with physiological level of ionic strength (in presence both of  $Ca^{2+}$  and EDTA) as well as ankyrin (135 мМ KCl,  $10^{-5}$  М  $Ca^{2+}$ ). Contrast tendencies were found in respect of protein 4.2, the level of which in MCC declines after transfusion both in the medium with physiological and high salt level. Chelating of bivalent cations in the solution of high ionic strength is accompanied also by the reduction of ankyrin content and band 4.1 protein mediating the contacts of spectrin-actin net with integral proteins of plasma membranes.

The tendency to weakening the bonds of protein 4.1, protein 4.2 and ankyrin in frozen-thawed cells after transfusion may testify to the weakening of vertical contacts in MCC of the erythrocytes that principally results in destabilization of membrane and reduction of mechanical resistance of cells [9], especially in stress conditions at shift deformations when passing through the capillaries of blood bed. Under these conditions there is found an increase of relative content of actin that likely testifies to the preserving of tight contacts in junction complexes of spectrin-actin net.

## Conclusions

Cryopreservation of erythrocytes under PEO-1500 protection leads to modifications of PPI in MCC that is accompanied with the change in relative content of band 3 protein, ankyrin, protein 4.1, protein 4.2 and protein 4.9, revealed in the solutions with high ionic strength and varied content of bivalent cations.

Cryopreservation of erythrocytes under PEO-1500 protection and freezing of cells in the medium containing no cryoprotectants have common regularities reflecting the effect of low temperatures on MCC proteins at the absence of stabilizing substances inside cells.

Changes in the MCC of erythrocytes cryopreserved under PEO-1500 protection may be partially reversible at cell transfer into physiological conditions.

## References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A., Bondarenko T.P. Structural changes of biochemical membranes during cooling.— Kiev: Naukova dumka, 1982.— 255 p.

**Таблица 4.** Состав МЦК эритроцитов после моделирования трансфузии: 1 – интактные клетки; 2 – клетки, преинкубированные с ПЭО-1500 при 0-4°C, после замораживания-отогрева и моделирования трансфузии, .

**Table 4.** Composition of erythrocyte MCC after transfusion simulation: 1 – intact cells; 2 – frozen-thawed erythrocytes pre-incubated with PEO-1500 at 0-4°C after transfusion simulation.

Среда Medium	Дополнительные компоненты среды Additional components of medium	Группа Group	Белки МЦК эритроцитов Proteins of erythrocyte MCC							
			$\alpha$ -спектрин $\alpha$ -spectrin	$\beta$ -спектрин $\beta$ -spectrin	Ангирутин Angiuritin	Б. п. 3 Band 3 protein	Б. п. 4.1 Protein 4.1	Б. п. 4.2 Protein 4.2	Б. п. 4.9 Protein 4.9	Post б.п.5 Post band 5 protein
B	$10^{-3}$ M $Ca^{2+}$ , $10^{-3}$ M $Mg^{2+}$	1	8,8±0,6	10,50±0,49	3,50±0,27	16,70±0,39	4,60±0,49	3,90±0,25	1,80±0,09	3,6±0,28
		2	9,1±0,9	12,10±0,29	6,10±0,95*	18,40±2,45	4,30±0,55	3,40±0,09*	2,10±0,12*	4,0±0,35
	2 мМ ЭДТА 2 мМ EDTA	1	8,4±0,9	10,60±1,25	3,80±0,59	16,8±1,0	4,00±0,16	3,8±0,2	1,40±0,07	3,7±0,3
		2	7,7±0,6	12,30±0,23	3,90±0,83	19,30±0,35	3,90±0,87	3,30±0,35	2,00±0,12	4,3±0,3
C	$10^{-3}$ M $Ca^{2+}$ , $10^{-3}$ M $Mg^{2+}$	1	9,8±0,9	12,00±0,66	4,40±0,31	14,80±0,42	4,40±0,13	4,50±0,34	1,50±0,11	4,1±0,31
		2	8,1±0,3	12,40±1,04	3,70±0,54	14,00±0,23	4,00±0,09*	3,70±0,09*	1,70±0,03	4,3±0,38
	2 мМ ЭДТА 2 мМ EDTA	1	10,0±0,6	12,00±0,45	4,90±0,38	16,4±0,5	5,1±0,2	4,10±0,21	1,70±0,23	4,0±0,24
		2	10,0±0,2	14,30±0,46	3,80±0,18*	15,7±1,7	3,20±0,15*	3,20±0,35*	1,50±0,12	4,8±0,06*

**Примечание:** \* – данные отличаются от контроля с уровнем  $P < 0,05$ . Результаты представлены в процентах от общего содержания белка в виде  $M \pm SE$ .

**Note:** \* – the data differ from the control with  $P < 0.05$ . The results are presented in percentage from total protein content as  $M \pm SE$ .

падает после трансфузии как в среде с физиологическим, так и с высоким уровнем солей. Хелатирование двухвалентных катионов в растворе с высокой ионной силой сопровождается также снижением содержания анкирина и б. п. 4.1, которые опосредуют контакты спектрин-актиновой сети с интегральными белками плазматической мембраны. Тенденция ослабления связей б. п. 4.1, б. п. 4.2 и анкирина в криоконсервированных клетках после трансфузии может свидетельствовать об ослаблении вертикальных контактов в МЦК эритроцитов, что в принципе приводит к дестабилизации мембраны и снижению механической прочности клеток [9], особенно в стрессовых условиях при сдвиговых деформациях в процессе прохождения через капилляры кровеносного русла. В данных условиях отмечается увеличение относительного содержания актина, что, по-видимому, свидетельствует о сохранении прочных контактов в узловых комплексах спектрин-актиновой сети.

### Выводы

Криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭО-1500 ведет к модификациям ББВ в МЦК, что сопровождается изменением относительного содержания б.п.3, анкирина, б.п.4.1, б.п.4.2 и б.п.4.9, обнаруживаемых в растворах с высокой ионной силой и варьирующим содержанием двухвалентных катионов.

Криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭО-1500 и замораживание клеток в среде, не содержащей криопротекторов, имеет общие закономерности, отражающие действие низких температур на белки МЦК при отсутствии внутри клеток стабилизирующих веществ.

Изменения в МЦК эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, могут быть частично обратимыми при переносе клеток в физиологические условия.

### Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Структурные изменения биохимических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
2. Белоус А.М., Бабичук Л.А., Землянский Н.Г. Влияние дозированной обработки полиэтиленоксидом м.м.1500 на изменение формы и проницаемости плазматической мембраны эритроцитов // Докл. АН УССР.– 1988.– №7.– С. 59-63.
3. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 208 с.
4. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. Т.1. Конформация биологических макромолекул.– М.: Мир, 1984.– 336 с.
5. Козлов М.М., Маркин В.С. Мембранный скелет эритроцита. Теоретическая модель // Биологические мембраны.– 1986.– Т.3, №4.– С.404-422.

2. Belous A.M., Babichuk L.A., Zemlyanskikh N.G. Effect of dosed treatment with polyethylene oxide of 1500 m.m. on change of shape and permeability of erythrocyte plasma membrane // Doklady AN SSSR.– 1988.– N7.– P. 59-63.
3. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes at low temperatures.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 208 p.
4. Cantor Ch., Schimmel P. Biophysical chemistry. P1. The conformation of biological macromolecules.– Moscow: Mir, 1984.– 336 p.
5. Kozlov M.M., Markin V.S. Membrane skeleton of erythrocyte. Theoretical model // Biol. Membrany.– 1986.– Vol.3, N4.– P. 404-422.
6. Konev S.V. Structural lability of membranes and regulatory processes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1987.– 240 p.
7. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. Cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1978.– 204p.
8. Yakovenko E. E., Rozenberg Yu.M., Kolodey S.V. etc. Analysis of filtration ability of erythrocyte non-homogeneous suspensions // Biol. Membrany.– 2001.– Vol.18, N1.– P. 16-28.
9. An X.L., Takakuwa Y., Nunomura W., et. al. Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1 // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N52.– P. 33187-33191.
10. Azim A.C., Knoll J.H.M., Beggs A.H. et al. Isoform cloning actin binding and chromosomal localization of human erythroid dematin, a member of the villin superfamily // J. Biol. Chem.– 1995.– Vol. 270, N29.– P. 17407-17413.
11. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood.– 2003.– Vol. 101, N10.– P. 4180-4188.
12. Chasis J.A., Mohandas N., Shohet J.B. Erythrocyte membrane rigidity induced by glycophorin A - ligand interaction: evidence for a ligand-induced association between glycophorin A and skeletal proteins // J. Clin. Invest.– 1985. – Vol. 75, N6.– P. 1919-1926.
13. Eber S., Lux S.E. Hereditary spherocytosis – defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer // Sem. Hematol. – 2004.– Vol. 41, N2.– P. 118-141.
14. Fairbanks G., Steek T.L., Wallach D.F.H. Electrolytic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane // Biochem.– 1971.– Vol. 10, N13.– P. 2606-2617.
15. Levitt J.A. Sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants // J. Theor. Biol.– 1962. – Vol. 3, N??.– P. 355-391.
16. Mauro-Chanteloup I., Delaunay J., Gane P. et al. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47 // Blood.– 2003.– Vol. 101, N1.– P. 338-344.
17. Risinger M.A., Dolimast E.M., Cohen C.M. Human erythrocyte protein 4.2, a high copy number membrane protein, is N-myristylated // J. Biol. Chem.– 1992.– Vol.267, N8.– P. 5680-5685.
18. Rybicki A.C., Health R., Wolf G.L. et al. Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane // J. Clin. Invest.– 1988.– Vol.81, N3. – P. 893-901.
19. Ursitti J.A., Fowler V.M. Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeletons // J. Cell Sci.– 1994.– Vol. 107, Pt. 6.– P. 1633-1639.
20. Van Dort H.M., Knowles D.W., Chasis J.A. et al. Analysis of integral membrane protein contribution to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N50.– P. 46968-46974.
21. Vertessy B.G., Steek T.L. Elasticity of human red cell membrane skeleton. Effect of temperature and denaturants // Biophys. J.– 1989.– Vol. 55, N2.– P. 255-262.

Accepted 13.06.06



6. *Конев С.В.* Структурная лабильность мембран и регуляторные процессы.– Минск: Наука и техника, 1987.– 240 с.
7. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
8. *Яковенко Е.Е., Розенберг Ю.М., Колодей С.В. и др.* Анализ фильтруемости неоднородных суспензий эритроцитов // Биологические мембраны.– 2001.– Т. 18, №1.– С. 16-28.
9. *An X.L., Takakuwa Y., Nunomura W., et al.* Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1 // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N52.– P. 33187-33191.
10. *Azim A.C., Knoll J.H.M., Beggs A.H. et al.* Isoform cloning actin binding and chromosomal localization of human erythroid dematin, a member of the villin superfamily // J. Biol. Chem.– 1995.– Vol. 270, N29.– P. 17407-17413.
11. *Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M. et al.* A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood.– 2003.– Vol. 101, N10.– P. 4180-4188.
12. *Chasis J.A., Mohandas N., Shohet J.B.* Erythrocyte membrane rigidity induced by glycophorin A - ligand interaction: evidence for a ligand-induced association between glycophorin A and skeletal proteins // J. Clin. Invest.– 1985. – Vol. 75, N6.– P. 1919-1926.
13. *Eber S., Lux S.E.* Hereditary spherocytosis – defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer // Sem. Hematol. – 2004.– Vol. 41, N2.– P. 118-141.
14. *Fairbanks G., Steek T.L., Wallach D.F.H.* Electrolytic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane // Biochem.– 1971.– Vol. 10, N13.– P. 2606-2617.
15. *Levitt J.A.* Sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants // J. Theor. Biol.– 1962. – Vol. 3.– P. 355-391.
16. *Mauro-Chanteloup I., Delaunay J., Gane P. et al.* Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47 // Blood.– 2003.– Vol. 101, N1.– P. 338-344.
17. *Risinger M.A., Dolimast E.M., Cohen C.M.* Human erythrocyte protein 4.2, a high copy number membrane protein, is N-myristylated // J. Biol. Chem.– 1992.– Vol.267, N8.– P. 5680-5685.
18. *Rybicki A.C., Health R., Wolf G.L. et al.* Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a Coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankyrin on the membrane // J. Clin. Invest.– 1988.– Vol.81, N3. – P. 893-901.
19. *Ursitti J.A., Fowler V.M.* Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeletons // J. Cell Sci.– 1994.– Vol. 107, Pt. 6.– P. 1633-1639.
20. *Van Dort H.M., Knowles D.W., Chasis J.A. et al.* Analysis of integral membrane protein contribution to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 2001.– Vol. 276, N50.– P. 46968-46974.
21. *Vertessy B.G., Steck T.L.* Elasticity of human red cell membrane skeleton. Effect of temperature and denaturants // Biophys. J.– 1989.– Vol. 55, N2.– P. 255-262.

*Поступила 13.06.06*