

УДК 547.569.2+547.46'054.4:576.314

И.Т. Иванов*, Б.К. Първанова

Влияние проникающих криопротекторов на мембранный скелет эритроцитов

UDC 547.569.2+547.46'054.4:576.314

I.T. Ivanov*, B.K. Paarvanova

Effect of Permeant Cryoprotectants on Membrane Skeleton of Erythrocytes

Реферат: С помощью метода термической диэлектроскопии изучено влияние формамида (ФА), N-метилформамида (МФА), N,N-диметилформамида (ДМФА) и диметилсульфоксида (ДМСО) на спектриновый мембранный скелет эритроцитов человека. При нагреве суспензии эритроцитов спектрин денатурирует при температуре 49,5°C, вызывая изменение импеданса суспензии на $\Delta Z^* = \Delta Z' + j\Delta Z''$. График зависимости $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$ показывает две диэлектрические релаксации на спектрине: бета- (0,05–1,0 МГц) и гамма- (1,0–10 МГц) релаксации. Криопротекторы ДМФА и ДМСО в концентрациях до 5 М (адекватных используемым при криоконсервировании) специфически ингибировали гамма-релаксацию, тогда как ФА и МФА – бета-релаксацию. Каждый эффект устранялся предварительным отмыванием от криопротектора и предположительно не зависел от создаваемого осмотического давления. Действие ДМСО и ФА при комбинированном использовании взаимно нейтрализовалось. На основании ранее полученных данных и результатов настоящего исследования установлено, что тестируемые криопротекторы отделяли мембранный скелет от липидной мембраны клеток, тем самым нарушая целостность клеток.

Ключевые слова: органический растворитель, токсичность криопротектора, мембрана эритроцита, спектриновый скелет, место прикрепления.

Реферат: За допомогою методу термічної діелектроскопії вивчено вплив формаміду (ФА), N-метилформаміду (МФА), N,N-диметилформаміду (ДМФА) і диметилсульфоксиду (ДМСО) на спектриновий мембранный скелет еритроцитів людини. При нагріванні суспензії еритроцитів спектрин денатурує за температури 49,5°C, викликаючи зміну імпедансу суспензії на $\Delta Z^* = \Delta Z' + j\Delta Z''$. Графік залежності $-\Delta Z''$ від $\Delta Z'$ показує дві діелектричні релаксації на спектрині: бета- (0,05–1,0 МГц) і гамма- (1,0–10 МГц) релаксації. Криопротектори ДМФА і ДМСО в концентраціях до 5 М (адекватних для використання під час криоконсервування) специфічно інгібували гамма-релаксацію, тоді як ФА і МФА – бета-релаксацію. Кожен ефект усувався попередніми відмиванням від криопротектору і, ймовірно, не залежав від створюваного осмотичного тиску. За комбінованого використання дії ДМСО і ФА взаємно нейтралізувалася. На підставі раніше отриманих даних і результатів цього дослідження встановлено, що протестовані криопротектори відокремлювали мембранный скелет від ліпідної мембрани клітин, тим самим порушуючи цілісність клітин.

Ключові слова: органічний розчинник, токсичність криопротектору, мембрана еритроцита, спектриновий скелет, місце прикріплення.

Abstract: The impact of formamide (FA), N-methylformamide (MFA), N,N-dimethylformamide (DMF) and dimethylsulfoxide (DMSO) on the spectrin-based membrane skeleton of human erythrocytes was studied by thermal dielectroscopy. Upon heating the erythrocyte suspension, spectrin denatures at 49.5°C causing suspension impedance to change by $\Delta Z^* = \Delta Z' + j\Delta Z''$. The $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ plot reveals two dielectric relaxations on spectrin, called beta (0.05–1.0 MHz) and gamma (1.0–10 MHz) relaxations. At concentrations up to 5 M (relevant to cryoprotection) DMF and DMSO specifically subdued gamma-relaxation, while FA and MFA specifically inhibited beta-relaxation. Each effect was eliminated by preliminary washing of cryoprotectant and presumably did not depend on the osmotic pressure produced. Applied in combination, DMSO and FA neutralized their effects. Based on previous study, the results indicate that tested cryoprotectants detached the membrane skeleton from the lipid membrane, thereby compromising cell integrity.

Key words: organic solvent, cryoprotectant toxicity, erythrocyte membrane, spectrin skeleton, attachment site.

Успешное криоконсервирование невозможно без понимания механизмов токсичного влияния криопротекторов на биообъекты. Формамид (ФА), метилформамид (МФА), диметилформамид (ДМФА) и диметилсульфоксид (ДМСО) легко проникают через большинство биологических мембран и часто используются для криоконсервирования клеток, тканей и органов [3]. Ток-

Successful cryopreservation is unfeasible without understanding the mechanisms of cryoprotectant toxicity on biological objects. Formamide (FA), methyl formamide (MFA), dimethyl formamide (DMF) and dimethylsulfoxide (DMSO) can easily permeate via the most of biological membranes and are frequently used to cryopreserve cells, tissues and organs [3]. The toxicity of DMSO can be reduced

Фракийский университет, м. Стара Загора, Болгария

Thracian University, Stara Zagora, Bulgaria

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Армійська, 11, м. Стара Загора, Болгарія 6000;
тел.: +(359 89) 994-64-50
електронна пошта: ivanov_it@gbg.bg

*To whom correspondence should be addressed:

11, Armeyska str., Stara Zagora, Bulgaria 6000;
tel.: + 359 89 994 6450
e-mail: ivanov_it@gbg.bg

Надійшла 15.12.2018

Прийнята до друку 03.09.2019

Received December, 15, 2018

Accepted September, 03, 2019

© 2019 I.T. Ivanov, 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.

сичность ДМСО может быть снижена при смешивании с другими криопротекторами, чаще всего с ФА. Так, ФА считают наиболее высокотоксичным из применяемых криопротекторов [5], но при использовании смешанных защитных сред с ДМСО токсичность значительно снижается у обоих криопротекторов [8]. Механизм такой взаимной нейтрализации токсичности обоих криопротекторов остается до сих пор необъясненным.

Нарушения в клеточной мембране являются одними из проявлений токсичности и чаще всего связаны именно с действием проникающих криопротекторов. Плазматическая мембрана эритроцитов человека также подвергается изменениям при контакте с проникающими криопротекторами, а при превышении определенного уровня концентрации может развиваться гемолиз клеток [1]. Мембрана эритроцита состоит из липидного бислоя, поддерживаемого спектриновым цитоскелетом. Спектрин – основной нитевидный мультидоменный белок, который испытывает термическую денатурацию при температуре 49,5°C (TA) [4]. Спектриновый скелет связан с липидной мембраной в двух местах прикрепления, сильно влияющих на целостность и механические свойства эритроцитов [10].

Ранее методом диэлектрической спектроскопии мы исследовали суспензии эритроцитов, подвергнутые нагреванию [7]. Диэлектрические параметры образца суспензии резко изменялись при температуре денатурации спектрина (TA), при этом частотная зависимость этих изменений выявила две диэлектрические релаксации на спектриновом скелете. Основное заключение состояло в том, что величина каждой релаксации зависит от доступных мест прикрепления. В настоящем исследовании мы использовали данный подход для изучения влияния ФА, МФА, ДМФА и ДМСО в концентрациях, не вызывающих гемолиз, на мембранный скелет эритроцитов и его связи с мембраной.

Материалы и методы

Все использованные в работе вещества (формамид, N-метилформамид, N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид, 2,6-дифторпиридин, NaCl и маннит) произведены компанией «Sigma Chemicals Co» (США).

Для приготовления образцов суспензий эритроциты отделяли от плазмы крови человека центрифугированием (250g, 5 мин), отмывали один раз в избыточном объеме изотонического раствора 0,15 M NaCl и два раза в комбинированном растворе (0,01 M NaCl и маннита). Далее эритроциты добавляли в комбинированную рабо-

by mixing with other cryoprotectants, most frequently with FA. Although FA is reputedly the most toxic cryoprotectant [5] the combination of FA with DMSO showed greatly reduced toxicity below that of either DMSO or FA alone [8]. The mechanism of this mutual neutralization of both cryoprotectant toxicities remains unexplained.

Cell membrane impairment is a particular kind of toxicity, most frequently associated with permeant cryoprotectants. The plasma membrane of human erythrocytes also alters on contact with the permeant cryoprotectants. Beyond a specific concentration limit this alteration results in hemolysis [1]. The erythrocyte membrane consists of a lipid membrane, supported by spectrin-based membrane skeleton. Spectrin is a major filamentous multidomain protein, which sustains thermal denaturation at 49.5°C (TA) [4]. The spectrin skeleton is associated to the lipid membrane by two attachment sites, the state of which strongly affects the integrity and mechanical properties of erythrocytes [10].

We have recently applied the method of dielectric spectroscopy on heated suspensions of erythrocytes [7]. The dielectric parameters of sample suspension sharply changed at the temperature of spectrin denaturation (TA) and the frequency dependence of these changes revealed two dielectric relaxations on spectrin skeleton. The main conclusion was that the strength of each relaxation depends on the attachment sites available. In recent study we used this approach to investigate the impact of FA, MFA, DMF and DMSO on the membrane skeleton of erythrocytes and its attachment at concentrations which still does not produce hemolysis.

Materials and methods

All used in this research substances (formamide, N-methylformamide, N,N-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, 2,6-difluoropyridine, NaCl and mannitol) were purchased from Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO, USA.

To prepare the samples of suspensions the erythrocytes were isolated from human blood plasma by centrifugation (250g, 5 min), washed in excess isotonic solutions of 0.15 M NaCl (once) and twice in a combined solution (0.01 M NaCl and mannitol). Afterwards erythrocytes were added to the working medium (isotonic solution of 0,01 M NaCl and mannitol) containing tested cryoprotectant at indicated concentration. Prior to testing sufficient time (25 min, including the time to approach the TA temperature) was provided for the cryoprotectant to equilibrate on both sides of plasma membranes and restore the isotonic volume of erythro-



чую среду (изотонический раствор 0,01 М NaCl и маннит), содержащую определенную концентрацию тестируемого криопротектора. Эритроциты перед тестированием инкубировали с криопротектором в течение времени (25 мин, включая время достижения температуры ТА), достаточного для его уравнивания с обеих сторон плазматических мембран и восстановления изотонического объема эритроцитов. Взвешенные эритроциты рассматривали как «ансамбль» сферических частиц из-за их огромного количества и хаотичной ориентации.

Термический анализ комплексного импеданса Z^* суспензии эритроцитов проводили, помещая образец суспензии (70 мкл) в кондуктометрическую кювету, которую нагревали с постоянной скоростью 1,5 град/мин [7]. Комплексный импеданс $Z^* = Z' + jZ''$ нагретой суспензии непрерывно измеряли с помощью анализатора «Solartron 1260» («Schlumberger Instruments», Великобритания). При этом j – мнимая единица, $j^2 = -1$. Данные для действительной Z' и мнимой Z'' частей от Z^* собирали и хранили на электронном носителе. Значения Z^* измеряли при 16 частотах между 0,04 и 10 МГц, последовательно сканировали со временем интегрирования 0,5 с. При такой скорости нагрева мембраны эритроцитов сохраняют свою непроницаемость для ионов в интервале температур 37–56°C [9].

Комплексный импеданс Z^* нагретой суспензии претерпевает частотно-зависимые изменения при температуре денатурации спектрина ТА [7] (рис. 1, для реального импеданса Z'), которые корректировали с учетом влияния температуры на проводимость суспензии, как описано ранее [7].

Диэлектрическая активность денатурированного спектрина ничтожно мала на всех частотах, а диэлектрические свойства цитозоля и внеклеточных сред не изменяются во время денатурации спектрина. Поэтому мы предположили, что скорректированные диэлектрические изменения $\Delta Z'$ и $\Delta Z''$ отражают вклад спектринового мембранного скелета в диэлектрические свойства мембраны эритроцитов [7]. Для изучения этого эффекта был построен и проанализирован график зависимости

cytes. Due to their immense number and random orientation, the suspended erythrocytes were regarded as an ensemble of spherical particles.

Thermal analysis of the complex impedance, Z^* , of erythrocyte suspension was performed by placing the sample of suspension (70 μ l) into a conductometric cuvette which was heated with constant heating rate of 1.5 deg/min [7]. The complex impedance, $Z^* = Z' + jZ''$, of heated suspension was continuously measured with a Solartron 1260 impedance analyzer (Schlumberger Instruments, Hampshire, England). Here, j is the imaginary unit, $j^2 = -1$. Data for the real part, Z' , and imaginary part, Z'' , of Z^* were collected and stored in computer. The Z^* values were measured at 16 frequencies between 0.04 and 10 MHz, and scanned sequentially with an integration time of 0.5 s. At this heating rate the erythrocyte membranes retain their impermeability to ions in the temperature range of 37 to 56°C [9].

The impedance, Z^* , of heated suspension sustains frequency-depending changes at the temperature of spectrin denaturation, TA [7] (exemplified by Fig. 1 for Z'). Prior to be used these changes were corrected for the continuous effect of temperature on suspension conductivity as explained before [7].

As the dielectric activity of denatured spectrin is nil at all frequencies and the dielectric properties

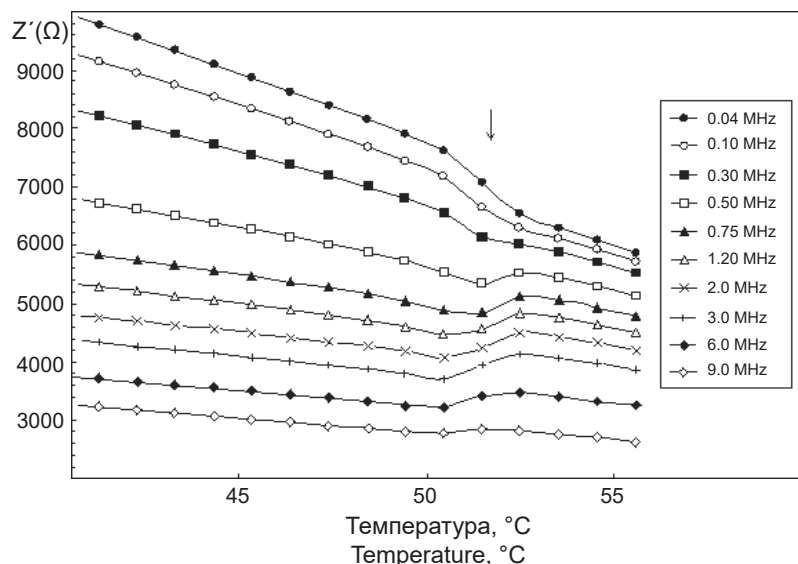


Рис. 1. Влияние частоты на температурный профиль реального импеданса Z' суспензии эритроцитов. Суспендирующая среда представляла собой изотонический раствор 0,01 М NaCl и маннита. Гематокрит и скорость нагрева составляли 0,45 и 1,5 град/мин соответственно. Для удобства показаны только 10 из 16 измеряемых частот. Стрелка указывает на температуру денатурации спектрина, T_A .

Fig. 1. Effect of frequency on the temperature profile of real impedance, Z' , of erythrocyte suspension. Suspension medium was isotonic solution of 0.01 M NaCl and mannitol. The hematocrit and heating rate were 0.45 and 1.5 deg/min, respectively. For convenience, only 10 from 16 measuring frequencies are shown. Arrow indicates the denaturation temperature of spectrin, T_A .

$-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$ (рис. 2) в соответствии с методами диэлектрической спектроскопии [2, 7].

Результаты и обсуждение

Полученная зависимость $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$ для эритроцитов, суспендированных в рабочей среде, представлена в виде дуг, одна из которых расположена над осью абсцисс, другая – под ней (рис. 2). Согласно диэлектроскопическим методам частотного анализа данных импеданса [2], каждая дуга соответствует отдельной диэлектрической релаксации на спектрине [6,7]. Диэлектрическая бета-релаксация (верхняя дуга) была обнаружена в интервале частот (0,01–1 МГц), на нижней границе которого проникновение поля в цитозоль невозможно. Критическая частота бета-релаксации совпадала с критической частотой межфазной бета-дисперсии на липидной мембране. Величина этой релаксации (радиус соответствующего полукруга) была сильно уменьшена вследствие разрыва мест прикрепления мембранного скелета. Поэтому мы предположили, что в эту релаксацию включен прямой пьезоэффект на эластичные сегменты спектринных филаментов, питаемый электрострикцией липидной мембраны через места прикрепления. Диэлектрическая гамма-релаксация (нижняя дуга) выявлена на частотах 1,0–10 МГц, которые позволяют электрическому полю проникать в цитозоль и напрямую взаимодействовать с диполями, связанными с эластичными сегментами спектрина. Критическая частота диэлектрической гамма-релаксации зависит от вязкости и ионной концентрации цитозоля [7]. Ее величина (радиус соответствующего полукруга) была также уменьшена после разрыва мест прикрепления.

На рис. 2, В представлена эквивалентная электрическая схема, моделирующая экспериментальные данные графика зависимости $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$. В данном исследовании для количественного описания релаксаций мы использовали электрическую модель, состоящую из двух последовательно соединенных цепей, каждая из которых содержала параллельно подключенные резистор и конденсатор. Для расчета модели использовали следующие параметры: $R_{\beta} = 1410 \text{ Ом}$, $C_{\beta} = 403 \text{ pF}$, $R_{\gamma} = -760 \text{ Ом}$, $C_{\gamma} = -65 \text{ pF}$, $f_{\beta} = 0,32 \text{ МГц}$ и $f_{\gamma} = 2,5 \text{ МГц}$ (таблица). Значения R_{β} и C_{β} левого контура являются оптимальными для описания бета-релаксации, в то время как значения R_{γ} и C_{γ} правого контура – для гамма-релаксации.

Используя закон Ома, мы получили суммарный комплексный импеданс $z^* = z' + jz''$ электри-

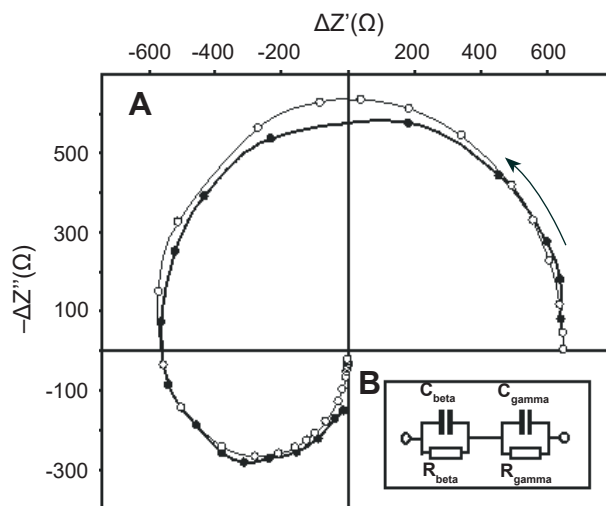


Рис. 2. Комплексный график изменений импеданса суспензии эритроцитов при температуре денатурации спектрина (А) и эквивалентная электрическая схема, моделирующая экспериментальные данные графика зависимости $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$ (В): \circ – расчетные данные; \bullet – экспериментальные данные зависимости $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$. Левая и правая RC-цепи моделируют бета- и гамма-диэлектрические релаксации на спектрине соответственно. Стрелкой показано увеличение частоты с 0,04 до 10 МГц.

Fig. 2. Complex plane plot of the changes in impedance of erythrocyte suspension at the temperature of spectrin denaturation (A) and the equivalent electric scheme modeling the experimental data of $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ plot (B). Data of the model fit (\circ) are compared with the experimental data (\bullet). The left and right RC circuits model the beta and gamma dielectric relaxations on spectrin, respectively. Arrow indicates the increase in frequency from 0.4 MHz to 10 MHz.

of cytosole and extracellular media do not change during spectrin denaturation, the corrected dielectric changes, $\Delta Z'$ and $\Delta Z''$, were supposed to express the contribution of spectrin-based membrane skeleton to the dielectric properties of erythrocyte membrane [7]. To study this contribution, the plot of $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ was obtained (Fig. 2) and analyzed according to the methods of dielectric spectroscopy [2, 7].

Results and discussion

The obtained dependence $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ for erythrocytes suspended in a working medium is presented as two semicircle arcs, one of them is located above abscissa axis, another is under it (Fig. 2). According to the dielectroscopic methods for frequency analysis of impedance data [2] each arc has been associated to a separate dielectric relaxation on spectrin [6, 7]. The beta dielectric relaxation, expressed by the upper arc, was detected within a frequency interval (0.01–1 MHz), the initial part of which does not allow field penetration into cytosole. Its critical frequency coin-

Модельное исследование бета- и гамма-релаксаций на спектриновом скелете эритроцитов под влиянием MFA и DMF ($n = 3, p < 0,05$)

Model study of the beta and gamma relaxations on the spectrin skeleton of erythrocytes as affected by the presence of MFA and DMF (number of samples of same blood was 3, $p < 0.05$)

Среда Medium	R_{β}, Ω	C_{β}, pF	R_{γ}, Ω	C_{γ}, pF	f_{β}, MHz	f_{γ}, MHz	$-R_{\gamma}/R_{\beta}$	$-C_{\gamma}/C_{\beta}$
Контроль Control	1410	403	-760	-65	0.32	2.5	0,54	0,161
MFA (2.85M)	1045	761	-900	-80,4	0.21	2.2	0,861	0,106
DMF (2.5M)	980	738,6	-310	-205,5	0.22	2.5	0,316	0,278

ческой модели, т. е. сумму комплексных импедансов левой и правой цепей:

$$z' = R_{\beta} / (1 + \omega^2 R_{\beta}^2 C_{\beta}^2) + R_{\gamma} / (1 + \omega^2 R_{\gamma}^2 C_{\gamma}^2)$$

$$z'' = \omega R_{\beta} C_{\beta} / (1 + \omega^2 R_{\beta}^2 C_{\beta}^2) + \omega R_{\gamma} C_{\gamma} / (1 + \omega^2 R_{\gamma}^2 C_{\gamma}^2),$$

где ω обозначает круговую частоту электрического тока.

Оптимальные значения R_{β} , C_{β} , R_{γ} и C_{γ} были найдены приближением теоретического графика (зависимость $-z''$ от z') к экспериментальной кривой (зависимость $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$) (рис. 2). Поскольку эти параметры линейно зависят от гематокрита суспензии, удобно использовать их отношения. Таковыми параметрами являются коэффициент диссипации энергии $-R_{\gamma}/R_{\beta}$ и коэффициент накопления энергии $-C_{\gamma}/C_{\beta}$, на спектре во время гамма-релаксации в отличие от бета-релаксации. Параметры для контрольных эритроцитов, суспендированных в рабочей среде, приведены в таблице.

Далее в работе исследовали влияние органических растворителей на диэлектрические релаксации. Присутствие ДМФА (2,5 М) в суспензии эритроцитов сопровождалось сильным ингибированием (снижение величины) гамма-релаксации, что выражалось в уменьшении радиуса соответствующей дуги по сравнению с контрольной суспензией (рис. 3). В то же время величина бета-релаксации сохранялась практически без изменений, что количественно выражалось в значительном уменьшении отношения R_{γ}/R_{β} и увеличении отношения C_{γ}/C_{β} (таблица). Аналогичный результат был получен при добавлении в суспензию эритроцитов ДМСО или 2,6-дифторпиридина в концентрациях 2,5 и 0,05 М соответственно (данные не приведены).

Присутствие 2,85 М МФА в суспензии эритроцитов вызывало сильное ингибирование бета-релаксации, что выражалось в уменьшении радиуса соответствующей дуги по сравнению

с критической частотой бета-релаксации на спектриновом скелете эритроцитов. Сила этой релаксации, выраженная радиусом соответствующей дуги, была сильно снижена при ингибировании мест прикрепления мембранного скелета. На основании вышеизложенного, эта релаксация была предположена включать прямой пьезоэффект на гибких сегментах спектриновых филаментов, питаемых электрострикцией липидной мембраны через места прикрепления. Гамма-диэлектрическая релаксация (нижняя дуга) была обнаружена на частотах 1–10 МГц, что позволило электрическому полю проникнуть в цитозоль и непосредственно взаимодействовать с диполями, связанными с гибкими сегментами спектрина. Критическая частота зависела от вязкости и ионной концентрации цитозоля [7]. Сила последней релаксации (радиус соответствующей дуги), также была снижена после ингибирования мест прикрепления.

Для получения количественного описания релаксаций в этом исследовании мы обратились к электрической модели, состоящей из двух цепей, соединенных последовательно, каждая из которых содержит параллельно соединенный резистор и конденсатор (рис. 2Б). Для расчета модели были использованы следующие параметры: $R_{\beta} = 1.410 \text{ Ohm}$, $C_{\beta} = 403 \text{ pF}$, $R_{\gamma} = -760 \text{ Ohm}$, $C_{\gamma} = -65 \text{ pF}$, $f_{\beta} = 0.32 \text{ MHz}$ и $f_{\gamma} = 2,5 \text{ MHz}$ (Таблица). R_{β} и C_{β} левой цепи представляют наилучшие значения для бета-релаксации, а R_{γ} и C_{γ} правой цепи — для гамма-релаксации.

Используя закон Ома, суммарный комплексный импеданс $z^* = z' + jz''$ электрической модели был получен как сумма комплексных импедансов левой и правой цепей в виде:

$$z' = R_{\beta} / (1 + \omega^2 R_{\beta}^2 C_{\beta}^2) + R_{\gamma} / (1 + \omega^2 R_{\gamma}^2 C_{\gamma}^2)$$

$$z'' = \omega R_{\beta} C_{\beta} / (1 + \omega^2 R_{\beta}^2 C_{\beta}^2) + \omega R_{\gamma} C_{\gamma} / (1 + \omega^2 R_{\gamma}^2 C_{\gamma}^2),$$

где ω — угловая частота тока.

Наилучшие значения R_{β} , C_{β} , R_{γ} и C_{γ} были найдены, приближая модельный график $(-\Delta Z''$

с контрольной суспензией эритроцитов (рис. 3), при этом величина гамма-релаксации сохранялась. Этот эффект выражался значительным увеличением $-R_{\text{gamma}}/R_{\text{beta}}$ и связанным с этим уменьшением соотношения $C_{\text{gamma}}/C_{\text{beta}}$ (таблица). Практически такой же результат был получен и в присутствии ФА при концентрации 5 М в исследуемой суспензии эритроцитов (данные не приведены).

Основываясь на результатах предыдущего исследования [7], мы предположили, что эффекты, вызванные тестируемыми криопротекторами на диэлектрические релаксации спектрина, свидетельствуют о частичном отщеплении мембранного скелета эритроцитов от липидной мембраны.

Для проверки обратимости эффектов, вызываемых исследуемыми криопротекторами, эритроциты сначала инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в рабочей среде, содержащей один из указанных растворителей, а затем трижды отмывали в рабочей среде. Гемолиз, вызванный начальным контактом суспензии в гипертонической среде, содержащей криопротектор, с отмывочной средой, предотвращали путем введения отмывочной среды небольшими порциями для уравнивания действия криопротектора при субкритическом набухании эритроцитов. Полученный график зависимости $-\Delta Z''$

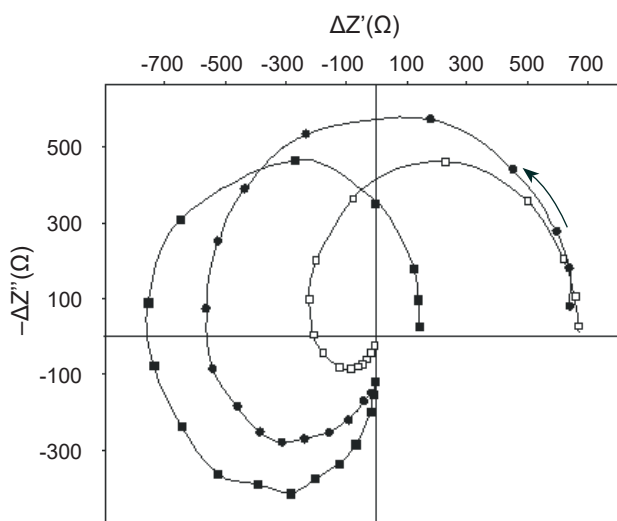


Рис. 3. Влияние МФА и ДМФА на комплексный импеданс при температуре денатурации спектрина эритроцитов, суспендированных в рабочей среде (●) и рабочей среде, содержащей МФА (■) либо ДМФА (□) в концентрациях 2,85 и 2,5 М соответственно.

Fig. 3. Effect of MFA and DMF on the complex plain plot of impedance changes at the spectrin denaturation temperature. The erythrocytes were suspended in working medium (●, control) and in working medium containing either MFA (■) or DMF (□) at final concentrations 2.85 M and 2.5 M, respectively.

vs. z') to the experimental curve ($-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$) (see Fig. 2). Since these parameters linearly depend on the suspension hematocrit, it is convenient to use their ratios. Such are the energy dissipation ratio, $-R_{\text{gamma}}/R_{\text{beta}}$, and energy storage ratio, $-C_{\text{gamma}}/C_{\text{beta}}$, which represent the amount of energy, dissipated and stored, respectively, on spectrin during the gamma relaxation relative to beta relaxation. For native erythrocytes, suspended in working medium, the values of these parameters are shown in Table (control).

Further in the research the effect of organic solvents on dielectric relaxations has been studied. The presence of DMF (2.5 M) in erythrocyte suspension was accompanied by strong inhibition (decrease in the strength) of gamma relaxation, as expressed by the reduction of the radius of respective semicircle, compared to control suspension (Fig. 3). At the same time, the strength of beta-relaxation was preserved almost intact. In quantitative terms this result was expressed by the strong decrease in $-R_{\text{gamma}}/R_{\text{beta}}$ ratio and related increase in $-C_{\text{gamma}}/C_{\text{beta}}$ ratio (Table). Almost the same result was obtained when the erythrocyte suspension contained either DMSO or 2,6-difluoropyridine at concentrations 2.5 M and 0.05 M, respectively (not shown).

The presence of 2.85 M MFA in the suspension resulted in strong inhibition of beta-relaxation, as expressed by the reduction of the radius of respective semicircle, compared to control erythrocyte suspension (Fig. 3), at the same time the strength of gamma-relaxation was preserved. This result was quantified by the strong increase in $-R_{\text{gamma}}/R_{\text{beta}}$ and related decrease in $-C_{\text{gamma}}/C_{\text{beta}}$ ratios (Table). Almost the same result was obtained when the tested erythrocyte suspension contained 5 M FA (not shown).

Based on previous results [7], it could be assumed that above mentioned effects, elicited by the test cryoprotectants on the dielectric relaxations of spectrin, indicate partial severance of the membrane skeleton of erythrocytes from the lipid membrane.

To check the reversibility of the effects, produced by tested cryoprotectants, the erythrocytes were first incubated in the working medium, containing one of the indicated solvents at room temperature for 30 minutes. Next, the erythrocytes were thrice washed in working medium. The hemolysis, caused by the initial contact of hypertonic, cryoprotectant containing, suspension to the washing medium was prevented by introducing the washing medium slowly and in small portions to allow equilibration of cryo-

от $\Delta Z'$ этих эритроцитов совпадал с соответствующим графиком для интактных клеток (не проведен).

Показано, что бинарный раствор ФА и ДМСО демонстрирует значительно меньшую токсичность, чем однокомпонентные растворы ДМСО или ФА [8]. Поэтому мы исследовали совместное действие ФА и ДМСО на диэлектрические релаксации спектрина. При комбинированном использовании высокой концентрации ФА (2,5 М) и ДМСО (1,4 М) установлены небольшие отличия от графика зависимости $\Delta Z''$ от $\Delta Z'$, полученного в присутствии только ФА. Однако при более низкой концентрации ФА (1,25 М) присутствие ДМСО (1,78 М) приводило к более значительным изменениям в графике, приближая его к графику для интактных эритроцитов. Следовательно, комбинацию ФА (0,7 М) и ДМСО (2,0 М) можно считать оптимальной, поскольку противоположные действия этих криопротекторов взаимно нейтрализуются, и график зависимости $-\Delta Z''$ от $\Delta Z'$ близок к контролю. Полученный результат и данные N.M. Jomha с соавт. [8] указывают на то, что по влиянию ДМСО и ФА на диэлектрические релаксации спектрина, т. е. на прикрепление сети спектрина к липидной мембране, можно судить о степени токсичности тестируемых криопротекторов.

Тестируемые криопротекторы, ввиду их высокой осмотической активности, создают осмотическое давление, намного превышающее изотоническое. Важно отметить, что 2,6-дифторпиридин способен ослабить гамма-релаксацию также, как ДМСО и ДМФА, но при концентрации в 50 раз ниже. Тестируемые растворители при практически одинаковом осмотическом давлении оказывают различные эффекты: ДМФА и ДМСО ингибируют гамма-релаксацию, тогда как ФА и МФА – бета-релаксацию. На основании полученных результатов можно предположить, что осмотическое давление (в условиях сохранности изотонического объема клеток) не является основным фактором влияния тестируемых криопротекторов на диэлектрические релаксации.

Кроме осмотического давления, в работе исследовали и другие параметры ФА, МФА, ДМФА, ДМСО и 2,6-дифторпиридина, которые могут объяснить их специфичность в ингибировании диэлектрических релаксаций. При этом вязкость, диэлектрическая проницаемость, дипольный момент и индекс полярности тестируемых растворителей не коррелировали с особенностями их действия. Однако разная способность образовывать водородные связи может определять их особенности. Действительно, полярные апротонные

protectant at subcritical swelling of erythrocytes. The obtained plot of $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ of these erythrocytes coincided with the respective plot of intact erythrocytes (not shown).

The binary solution of FA and DMSO has been shown to demonstrate greatly reduced toxicity below that of either DMSO or FA alone [8]. Hence, the combined action of FA and DMSO on the dielectric relaxations of spectrin was tested. At high concentration of FA (2.5 M) the presence of DMSO (1.4 M) produced little difference to the $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ plot, obtained at the presence of FA alone. However, at lower concentration of FA (1.25 M) the presence of DMSO (1.78 M) significantly altered the plot bringing it closer to that of intact erythrocytes. Consequently, there was an optimal combination of these cryoprotectants (FA 0.7 M and DMSO 2.0 M) at which their opposite effects on the $-\Delta Z''$ vs. $\Delta Z'$ plot neutralized themselves. This result, combined with above mentioned report [8], indicates that the effect of DMSO and FA on dielectric relaxations of spectrin *i. e.* attachment of spectrin network, to lipid membrane is important for the toxicity of tested cryoprotectants.

The tested solvents, due to their high osmotic activity, produced osmotic pressure highly exceeding the isotonic one. It should be noted that 2,6-difluoropyridine is capable of weakening the gamma relaxation in the same manner as both DMSO and DMFA, but at the concentration, which is 50 times lower. Moreover, the tested solvents produced different effects: DMF and DMSO inhibited gamma relaxation, while FA and MFA inhibited beta relaxation. Taken together, these results suggest that, provided the isotonic volume of erythrocytes was preserved, osmotic pressure was of little importance for the effects produced by tested cryoprotectants on dielectric relaxations.

In addition to osmotic pressure, other parameters of FA, MFA, DMF, DMSO and 2,6-difluoropyridine were also examined to explain the solvent specificity in the inhibition of dielectric relaxations. For example viscosity, dielectric permeability, dipole moment and polarity index of tested solvents does not correspond to their specificity. However, the manner these solvents are involved in hydrogen bond formation could be important for this specificity. Indeed, the polar aprotic solvents (DMF, DMSO and 2,6-difluoropyridine) inhibited gamma relaxation, while polar protic solvents (FA and MFA) subdued beta relaxation. According to recently published results of ours [6] the inhibition of gamma relaxation is a mark of severed spectrin-band 3 bridge, while the inhi-



растворители (ДМФА, ДМСО и 2,6-дифторпирин) ингибировали гамма-релаксацию, а полярные протонные растворители (ФА и МФА) – бета-релаксацию. В соответствии с нашими недавними результатами ингибирование гамма-релаксации является признаком разрыва связи спектрин-белок полосы 3, а ингибирование бета-релаксации сопровождается разрыв соединения спектрин-актин [6]. Таким образом, две группы полярных растворителей, разделенные по их способности отдавать или принимать протоны, могут оказывать специфическое диссоциирующее действие на разные места прикрепления мембранного скелета эритроцитов. Дальнейшие исследования помогут подробно объяснить специфическое действие тестируемых криопротекторов на диэлектрические релаксации спектрина и, соответственно, на прикрепление мембранного скелета.

Выводы

Две диэлектрические релаксации на спектрине и, соответственно, прикрепление спектринового скелета к липидной мембране эритроцитов подвергаются сильному и избирательному воздействию ряда полярных органических растворителей, часто используемых в качестве криопротекторов. Поскольку мембранный скелет есть практически во всех животных клетках, и его прикрепление к липидному бислою обеспечивает стабильность плазматических мембран и клеток, то представленные результаты могут быть использованы для разработки теоретических и практических положений при криоконсервировании клеток и тканей.

Данное исследование выполнено в рамках проекта № 5/2018-МФ Фракийского университета, Стара Загора, Болгария.

Литература

1. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1280(1):73–80.
2. Batyuk L, Kizilova N. Modeling of dielectric permittivity of the erythrocytes membrane as a three-layer model. In: Batyuk L, Kizilova N. *Development trends in medical science and practice: the experience of countries of Eastern Europe and prospects of Ukraine*. Monograph. Riga: Baltija Publishing; 2018. p. 18–37.
3. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*. 2015; 18(5):422–36.
4. Brandts JF, Erickson L, Lysko K, et al. Calorimetric studies of the structural transitions of the human erythrocyte membrane.

bition of beta relaxation accompanies the severance of spectrin-actin junction. Thus, the two groups of polar solvents, based on their ability to donate or accept protons, could have specific severing effect on different attachment sites of erythrocyte membrane skeleton. Future studies could explain in details the specific action of tested cryoprotectants on dielectric relaxations of spectrin, respectively on membrane skeleton attachment.

Conclusions

The two dielectric relaxations on spectrin and thereby, the attachment of spectrin-based skeleton to the lipid membrane of erythrocytes, appear to be strongly and selectively affected by a number of polar organic solvents, frequently used as cryoprotectants. As membrane skeleton is ubiquitous amongst all animal cells and its attachment to the lipid bilayer is highly important for the stability of plasma membranes and cells, the presented results appear useful for the theory and practice of cryopreservation of cells and tissues.

This work is supported by the project № 5/2018-МФ of the Thracian University, Stara Zagora, Bulgaria.

References

1. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1280(1):73–80.
2. Batyuk L, Kizilova N. Modeling of dielectric permittivity of the erythrocytes membrane as a three-layer model. In: Batyuk L, Kizilova N. *Development trends in medical science and practice: the experience of countries of Eastern Europe and prospects of Ukraine*. Monograph. Riga: Baltija Publishing; 2018. p. 18–37.
3. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*. 2015; 18(5):422–36.
4. Brandts JF, Erickson L, Lysko K, et al. Calorimetric studies of the structural transitions of the human erythrocyte membrane. The involvement of spectrin in the A transition. *Biochemistry*. 1977; 16:3450–4.
5. Fahy GM, Wolk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*. 2004; 48:22–35.
6. Ivanov IT, Paarvanova B. Thermal dielectroscopy study on the vertical and horizontal interactions in erythrocyte sub-membrane skeleton. *Electrochimica Acta*. 2019; 317: 289–300.
7. Ivanov IT, Paarvanova B. Dielectric relaxations on erythrocyte membrane as revealed by spectrin denaturation. *Bioelectrochemistry*. 2016; 110:59–68.
8. Jomha NM, Weiss AD, Forbes JF, et al. Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes. *Cryobiology*. 2010; 61:297–302.
9. Muravlyova LE, Molotov-Luchanskiy VB, Klyuyev DA, Kolesnikova EA. Comparative characteristics of erythrocytes charge



- The involvement of spectrin in the A transition. *Biochemistry*. 1977; 16:3450–4.
5. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*. 2004; 48:22–35.
 6. Ivanov IT, Paarvanova B. Thermal dielectroscopy study on the vertical and horizontal interactions in erythrocyte sub-membrane skeleton. *Electrochimica Acta*. 2019; 317: 289–300.
 7. Ivanov IT, Paarvanova B. Dielectric relaxations on erythrocyte membrane as revealed by spectrin denaturation. *Bioelectrochemistry*. 2016; 110:59–68.
 8. Jomha NM, Weiss AD, Forbes JF, et al. Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes. *Cryobiology*. 2010; 61:297–302.
 9. Muravlyova LE, Molotov-Luchanskiy VB, Klyuyev DA, Kolesnikova EA. Comparative characteristics of erythrocytes charge balance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Researcher*. 2013; 58:2263–8.
 10. Willardson BM, Thevenin BJ, Harrison ML, et al. Localization of the ankyrin-binding site on erythrocyte membrane protein, band 3. *J Biol Chem*. 1989; 264(27):15893–9.