

©Землянских

## ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ АГЕНТОВ НА БЕЛКИ МЕМБРАННО-ЦИТОСКЕЛЕТНОГО КОМПЛЕКСА ЭРИТРОЦИТОВ

*Н.Г. Землянских*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
Украина, 61016, Харьков, ул. Переяславская, 23; эл. почта: nzemliansky@gmail.com

Цель исследования заключалась в определении влияния глицерола и диметилсульфоксида (ДМСО), принадлежащих к эндоцеллюлярному типу криопротекторных агентов (КПА), а также полиэтиленгликоля, декстрана, сахарозы и маннитола, относящихся к экзоцеллюлярным КПА, на белки мембрано-цитоскелетного комплекса (МЦК) эритроцитов человека на этапе, предшествующем замораживанию. Оценка модификаций белков выполнена методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-ПААГ-электрофореза) с применением разных подходов при подготовке образцов для анализа. Использование  $\beta$ -меркаптоэтанола в составе солубилизирующего буфера продемонстрировало отсутствие изменений полипептидного профиля МЦК эритроцитов, предварительно инкубированных с КПА, что характеризует хорошую биосовместимость исследованных веществ. Применение “сшивающего” реагента диамида для оценки модификаций белков не выявило структурных нарушений, которые приводили бы к значительным изменениям локализации –SH-групп и увеличению образования высокомолекулярных полипептидных комплексов, идентифицируемых с помощью SDS-ПААГ-электрофореза без применения  $\beta$ -меркаптоэтанола. Вместе с тем, обнаружены изменения электрофоретической подвижности белков в зоне полосы 5 в эритроцитах, инкубированных с КПА в присутствии диамида, что указывает на реорганизацию структурного состояния актиновых протофиламентов, которые могут быть обусловлены изменениями самих актиновых мономеров или иницированы модификациями актин-связывающих белков в присутствии КПА. Кроме того, выявлено увеличение содержания белковой фракции, расположенной между полосами 5 и 6 в профилях МЦК эритроцитов, инкубированных в присутствии КПА с диамидом. Несмотря на видимость одинаковой реакции белков эритроцитов на разные КПА, свойства клеток, зависящие от МЦК, могут различаться благодаря модификациям в структуре макромолекул, не связанным с изменениями локализации –SH-групп белков. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием КПА в МЦК эритроцитов могут происходить определенные перестройки, детали которых требуют дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** эритроцит; мембрана; цитоскелет; белки; криопротектор; криоконсервирование

**DOI:** 10.18097/PBMC20206606456

### ВВЕДЕНИЕ

При низкотемпературном хранении биологических объектов используются различные криопротекторные агенты (КПА), которые делятся на два типа в зависимости от их способности проникать через плазматическую мембрану. Эндоцеллюлярные (проникающие) КПА реализуют свое защитное действие путем изменения физико-химических свойств микроокружения всех субклеточных компонентов. Однако, проникая через мембрану, такие КПА создают высокое осмотическое давление внутри клетки, что не позволяет использовать размороженные образцы сразу после их отогрева. Удаление КПА из клеток предотвращает осмотический шок, но требует существенных затрат времени и специфического материального обеспечения. Экзоцеллюлярные (непроникающие) КПА обеспечивают возможность применения размороженных клеток без удаления КПА, поскольку снижение их концентрации происходит путём постепенного разведения в физиологических условиях. Защитный эффект таких веществ связан с дегидратацией клеток и снижением риска образования внутриклеточных кристаллов льда, являющихся основным фактором повреждения субклеточных

компонентов. Однако при замораживании клеток под защитой экзоцеллюлярных КПА всё ещё не удаётся обеспечить приемлемый уровень жизнеспособности криоконсервированных клеток при возвращении в физиологические условия [1, 2].

В медицинской практике используют эритроциты человека, криоконсервированные под защитой глицерола [1], который гарантирует их высокую жизнеспособность при трансфузии, но имеет характерные недостатки эндоцеллюлярного КПА. Необходимость оптимизации методов криоконсервирования крови с целью упрощения или исключения этапа удаления КПА из клеток определяет актуальность детального изучения действия экзоцеллюлярных веществ на мембрано-цитоскелетный комплекс (МЦК) эритроцитов, от которого в значительной мере зависят стабильность и функциональная полноценность клеток в русле крови. Эффективным подходом для оценки влияния экзоцеллюлярных КПА на МЦК эритроцитов может быть сравнительное исследование изменений белков МЦК под влиянием экзоцеллюлярных КПА и глицерола. При этом для устранения тенденциозности трактовки результатов, связанной с возможностью специфических изменений в МЦК, обусловленных

эндо- и экзоцеллюлярным типом действия КПА, целесообразно при исследованиях дополнить группу эндоцеллюлярных веществ другим соединением. В частности, диметилсульфоксид (ДМСО) может удовлетворять этому требованию, поскольку широко используется при замораживании различных биообъектов.

Ранее при изучении влияния замораживания-отогрева на белки МЦК эритроцитов [2, 3], которые объединены в сложную многокомпонентную сеть, а также свободные белки сыворотки крови [4] была продемонстрирована возможность использования диамида для выявления их пространственно-конформационных модификаций. Диамид реагирует с  $-SH$ -группами аминокислот с образованием  $-S-S-$  мостиков между отдельными полипептидами, вследствие чего образуются высокомолекулярные полипептидные комплексы (ВПК), идентифицируемые с помощью SDS-ПААГ электрофореза. Количество ВПК зависит от доступности диамида к  $-SH$ -группам, локализация которых может меняться в результате модификации структуры макромолекулы под влиянием факторов среды. Важно отметить, что данные факты установлены после замораживания-отогрева образцов, и изменения в структуре белков в значительной степени могли быть связаны с действием факторов среды, сопутствующих переходу жидкой фазы в твёрдое состояние, в частности, образованием кристаллов льда [5]. Учитывая, что растворы КПА имеют определённые особенности поведения при температурных сдвигах ( $+37^{\circ}C \rightarrow -196^{\circ}C \rightarrow +37^{\circ}C$ ), степень повреждения белков может быть обусловлена спецификой солидации в присутствии разных КПА. Вместе с тем, известны факты модификации белков при непосредственном действии растворов КПА на клетки, а не только через их влияние на физико-химические процессы при замораживании-отогреве [6, 7]. Поэтому оценка влияния КПА разного типа действия на пространственно-конформационные модификации белков МЦК эритроцитов на этапе, предшествующем замораживанию, позволит определить степень влияния самих КПА на белки и может способствовать лучшему пониманию механизмов их защитного действия. Выявление критических изменений, влияющих на устойчивость клеток, может быть использовано для предотвращения негативных последствий в ходе разработки новых способов криоконсервирования биологических объектов с применением, прежде всего, экзоцеллюлярных КПА.

Цель исследования заключалась в оценке пространственно-конформационных изменений белков МЦК эритроцитов человека под влиянием глицерола и ДМСО, принадлежащих к группе эндоцеллюлярных КПА, а также полиэтиленгликоля (ПЭГ), декстрана, сахарозы и маннитола, относящихся к экзоцеллюлярным КПА. Модификации белков определяли по изменению доступности диамида к  $-SH$  группам макромолекул, характеризуемой количеством ВПК, и анализу белкового профиля теней эритроцитов с помощью SDS-ПААГ-электрофореза.

## МЕТОДИКА

В работе использовали следующие реактивы: диамид, фенолметилсульфонилфторид (PMSF), азид натрия ( $NaN_3$ ), Трис, HEPES, EDTA, додецилсульфат натрия (SDS),  $\beta$ -меркаптоэтанол, Coomassie BB G-250, акриламид, бис-акриламид, сахарозу ("Sigma", США), бромфеноловый синий ("Serva", Германия), ПЭГ м.м. 1500, декстран м.м. 40 кДа ("Fluka", США), ДМСО, глицерол, маннитол, ТХУ, NaCl,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  (х.ч. или ос.ч.) и другие реактивы производства России и Украины.

Исследования проведены на эритроцитах крови доноров, полученной из Центра службы крови (Харьков). Эритроциты отмывали от плазмы и лейкоцитов 3-кратным центрифугированием при 1200 g в течение 7 мин при комнатной температуре с помощью раствора 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl (pH 7,4).

Эритроциты инкубировали в течение 1 ч при  $37^{\circ}C$  в следующих средах: глицерол (2 M), смесь глицерола (3,25 M) и маннитола (0,22 M), ДМСО (2 M), сахароза (1 M), маннитол (1 M), ПЭГ (0,2 M), декстран (0,005 M). Все среды дополнительно включали 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl (pH 7,4). Эритроциты, инкубируемые в модифицированной среде Рингера (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 32 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM глюкоза), служили контролем. Все группы были разделены на 2 части, в одну из которых при инкубации добавляли диамид (конечная концентрация 2,5 mM).

Изолированные МЦК (тени) получали гипотоническим шоком с помощью раствора 10 mM натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, дополненного 0,1 mM PMSF (соотношение клеток и раствора ~1:30) при  $5^{\circ}C$  [8] с последующим центрифугированием при 20000 g в течение 10 мин при  $4^{\circ}C$ . Отмывку теней от гемоглобина проводили путём 3-кратного центрифугирования в аналогичных условиях. Аликвоты осаждённых теней эритроцитов, инкубированных с диамидом, солибилизировали в Sample-буфере: 0,05 M Трис-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 20% глицерол, 0,7 мг/мл PMSF, 0,4 мг/мл  $NaN_3$ , 0,01% бромфеноловый синий. Образцы, инкубированные без диамида, растворяли в Sample-буфере аналогичного состава, содержащем 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол.

Электрофорез (Protean II Multi-Gel Casting Chamber, "Bio-Rad", США) проводили в плоских вертикальных гелях по системе Лэммли [8]. Разделяющий градиентный гель содержал концентрации полимеризуемых веществ (акриламида и бис-акриламида) 5-20%. Белки в геле окрашивали Coomassie BB G-250 при  $25^{\circ}C$  в течение 1 ч. Избыток красителя отмывали 7% раствором уксусной кислоты. Для идентификации фракций использовали маркерные белки SM0661 ("Fermentas life sciences", Литва). Количественный анализ профиля белков (относительные изменения содержания полипептидов) выполняли с помощью программного обеспечения Gel ("Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины").

## ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ АГЕНТОВ НА БЕЛКИ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ

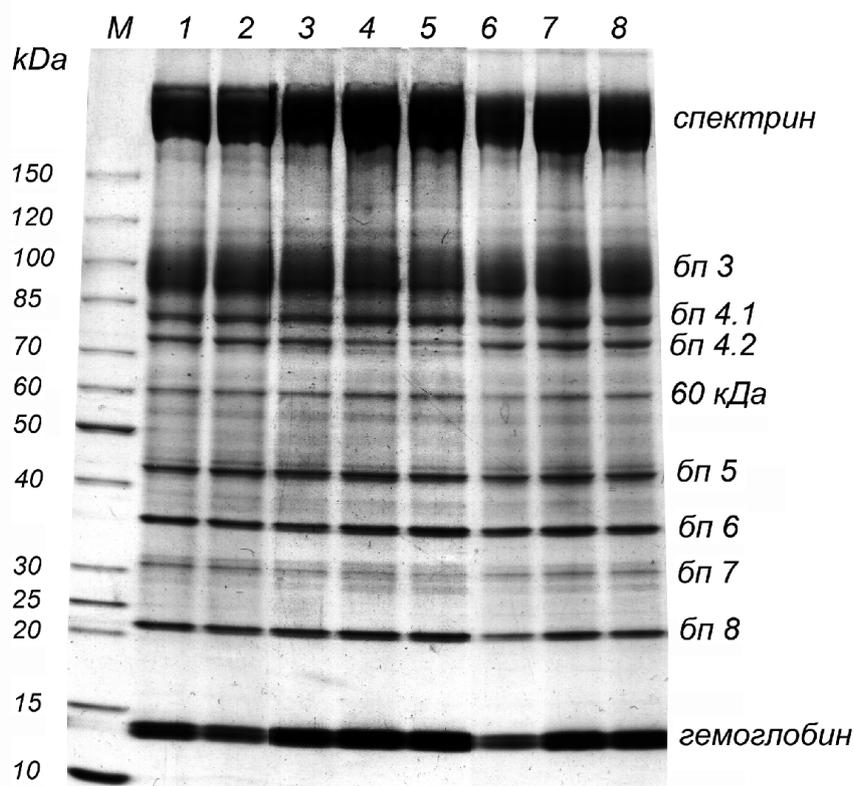
Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программного пакета "Statgraphics plus 2.1 for Windows". Выборки имели нормальное распределение по тесту Колмогорова-Смирнова. Эксперименты проведены на образцах крови четырёх здоровых доноров ( $n=4$ ). Различия между экспериментальными группами по уровню содержания белка в определённых фракциях оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименьшей значимой разницей. При  $p < 0,05$  данные считали статистически значимыми.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

МЦК эритроцитов является сложной многокомпонентной системой [9], поэтому модификация его отдельных элементов влияет на взаимодействия во всей сети связей периферических и интегральных белков, что отражается на устойчивости клеток в стрессовых условиях. Присутствие КПА с внешней стороны мембраны или по обе её стороны, определяющее изменение физико-химических свойств среды, может быть причиной модификации пространственно-конформационной упаковки отдельных макромолекул. Такие изменения могут вызвать диссоциацию белков из МЦК и/или способствовать ассоциации с ним цитозольных белков. Для оценки возможности таких изменений в МЦК под влиянием КПА было проведено

изучение полипептидного состава теней эритроцитов с использованием в солюбилизирующем буфере  $\beta$ -меркаптоэтанола, который восстанавливает дисульфидные связи между субъединицами белков и позволяет получить весь спектр отдельных полипептидов МЦК [8]. Полученные результаты (рис. 1) свидетельствуют об отсутствии качественных и количественных отличий от контроля в образцах, инкубированных с КПА. Это характеризует хорошую биосовместимость всех исследованных КПА, поскольку полипептидный состав МЦК остаётся стабильным в ходе процедуры получения теней эритроцитов, когда на белки, предварительно находящиеся под влиянием КПА, дополнительно накладывается влияние среды с низкой ионной силой. Однако это не означает, что белки остаются структурно неизменёнными. Отдельные компоненты вполне могут иметь модифицированные сайты, но сохраняются в составе теней, поскольку имеют контакты с несколькими белками одновременно [9]. В частности, потеря контактов с одним белком-партнёром в результате структурной модификации может быть сопряжена с неизменностью сайтов взаимодействия с другими партнерами, что позволяет конкретному белку сохраняться в составе МЦК, маскируя реальные структурные перестройки.

Более детальную информацию о модификациях белков под влиянием КПА может дать оценка доступности  $-SH$ -групп белков к диамиду, поскольку реагент способен действовать на все белки МЦК.

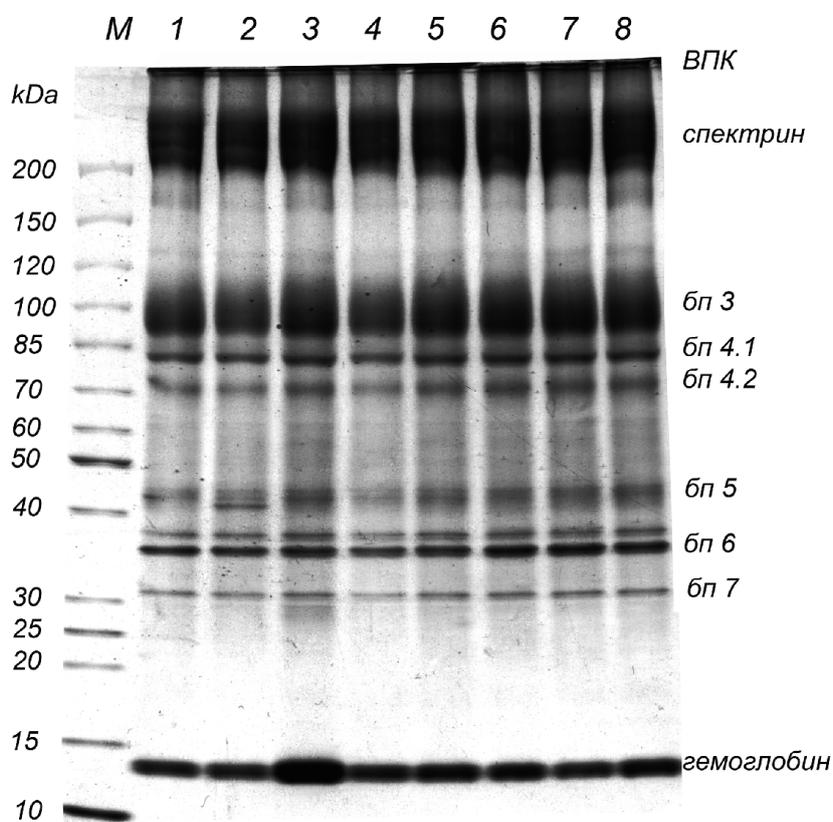


**Рисунок 1.** SDS-ПААГ-электрофорез белков теней эритроцитов человека, инкубированных в растворах КПА в отсутствии диамида. 1 — контроль (Рингер-глюкозная среда), 2 — глицерол (2 М), 3 — смесь глицерола (3,25 М) и маннитола (0,22 М), 4 — ДМСО (2 М), 5 — сахароза (1 М), 6 — маннитол (1 М), 7 — ПЭГ (0,2 М), 8 — декстран (0,005 М); М — маркеры; бп — белок полосы. Буфер для солюбилизации белков МЦК содержал  $\beta$ -меркаптоэтанола.

При этом ВПК, сформированные под действием диамида, могут включать субъединицы одного или разных типов белков в зависимости от локализации сайтов, содержащих –SH-группы, и их пространственной удалённости. В использованных экспериментальных условиях (концентрация диамида и условия инкубации) лишь незначительная часть спектрина, а также белков полос 3 и 5 включалась в образование ВПК в контрольных клетках [2]. Вместе с тем, белок с молекулярной массой 60 кДа и белок полосы 8, представляющие собой каталазу и пероксиредоксин 2 [10], практически полностью исчезали из электрофоретического профиля, что обусловлено легкой доступностью их функциональных –SH-групп для диамида.

Анализ электрофоретических профилей белков теней эритроцитов, инкубированных с КПА в присутствии диамида, не выявил статистически значимых различий по уровню образования ВПК

между различными экспериментальными группами, в том числе и относительно контроля (рис. 2, таблица). Вместе с тем, обнаружены два отличия от контроля белковых профилей теней эритроцитов, инкубированных в присутствии КПА. Первое изменение касается зоны белка полосы 5 (актин), которая в данных образцах представлена несколькими близко расположенными отдельными мелкими полосами или имеет диффузную локализацию (рис. 2), что особенно хорошо видно на денситограммах на примере эритроцитов, инкубированных в смеси глицерола и маннитола (рис. 3). Вторая особенность, выявленная в белковом профиле теней эритроцитов, инкубированных в присутствии КПА, связана с увеличением содержания белка фракции, расположенной между полосами 5 и 6 по сравнению с контролем ( $2,3 \pm 0,9\%$  в смеси глицерола (3,25 М) и маннитола (0,22 М) против  $1,1 \pm 0,2\%$  в контроле от общего содержания белка в образцах,  $p=0,013$ ).

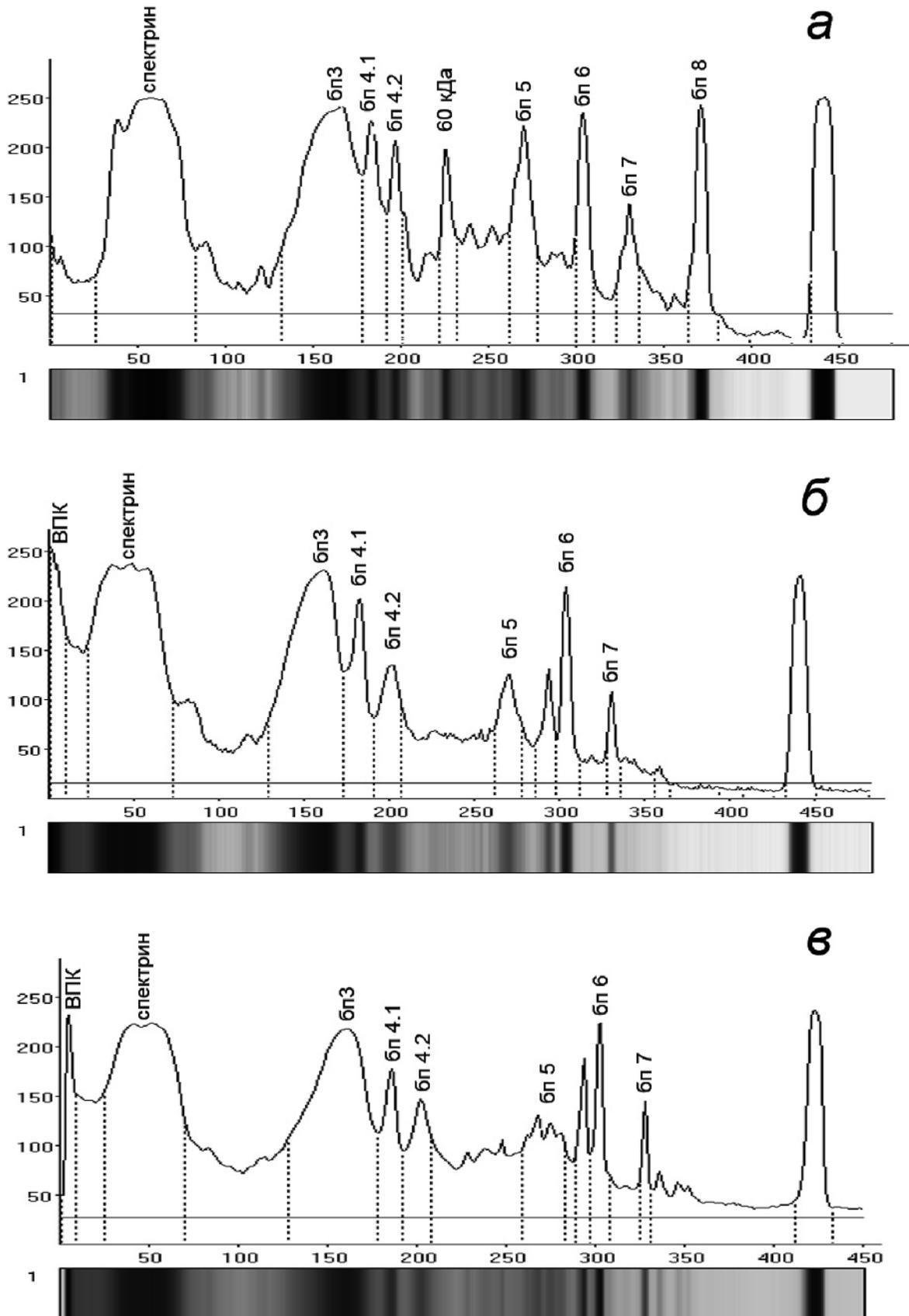


**Рисунок 2.** SDS-ПААГ-электрофорез белков теней эритроцитов человека, инкубированных в растворах КПА в присутствии диамида. 1 — контроль (Рингер-глюкозная среда), 2 — глицерол (2 М), 3 — смесь глицерола (3,25 М) и маннитола (0,22 М), 4 — ДМСО (2 М), 5 — сахароза (1 М), 6 — маннитол (1 М), 7 — ПЭГ (0,2 М), 8 — декстран (0,005 М), М — маркеры; бп — белок полосы.

**Таблица.** Содержание ВПК в тенях эритроцитов, экспонированных в растворах КПА в присутствии диамида

контроль (среда Рингера)	Растворы криопротекторных агентов						
	глицерол (2 М)	глицерол (3,25 М), маннитол (0,22 М)	ДМСО (2 М)	сахароза (1 М)	Маннитол (1 М)	ПЭГ (0,2 М)	декстран (0,005 М)
6,4±0,9	5,9±0,7	6,1±0,7	6,5±1,1	7,1±0,9	7,2±0,8	6,8±0,7	6,6±0,7

Примечание. Содержание ВПК представлено по отношению к общему количеству белка в пробе (%). Статистические отличия между экспериментальными группами и контролем не обнаружены.



**Рисунок 3.** Денситограммы белкового профиля теней эритроцитов. а — эритроциты, экспонированные в Рингер-глюкозной среде без диамида (рис. 1, дорожка 1); б — эритроциты, экспонированные в Рингер-глюкозной среде в присутствии диамида (рис. 2, дорожка 1); в — эритроциты, экспонированные в смеси глицерола (3,25 М) и маннитола (0,22 М) в присутствии диамида (рис. 2, дорожка 3). бп — белок полосы.

Интересно отметить, что данная фракция также была идентифицирована в большем количестве в МЦК эритроцитов после их замораживания-отогрева под защитой разных КПА [2]. Выявленный факт свидетельствует о том, что увеличение содержания данной фракции под влиянием диамида обусловлено не действием низкотемпературных факторов, а непосредственным влиянием КПА.

Изменения, отмеченные в зоне белка полосы 5, могут быть обусловлены варьированием электрофоретической подвижности отдельных мономеров актина вследствие образования внутримолекулярных “сшивок” под действием диамида, то есть соединения разных сайтов одного полипептида через –SH группы. Учитывая тот факт, что протофиламенты актина МЦК эритроцитов содержат 12-14 мономеров и связаны с целым рядом белков [9] на разных участках их длины, доступность диамида к отдельным актиновым мономерам на протяжении его длины может различаться. Кроме того, разные актин-связывающие белки также могут трансформироваться в разной степени под влиянием КПА, что открывает неравномерный доступ диамиду к –SH-группам актиновых мономеров в структуре протофиламентов. Оба механизма могут быть причиной разной реакции отдельных мономеров на действие диамида в условиях изменения параметров среды в цитозоле эритроцитов в присутствии КПА, вследствие чего и появляются несколько электрофоретически различающихся фракций белка. Следует отметить, что в актине непосредственно с диамидом могут реагировать 5 остатков цистеина [11]. Кроме того, потенциально подвергаться окислению могут также 16 остатков метионина [11]. Последствия модификации белков актиновых протофиламентов в эритроцитах для их стабильности в стрессовых условиях криоконсервирования оценить достаточно сложно, поскольку данные о влиянии КПА на данный белок противоречивы. В частности, известно, что 1,2-пропандиол (пропиленгликоль), сходный по структуре с глицеролом, в отсутствие солей, влияющих на полимеризацию, способствовал образованию полимеризованных филаментов, предположительно, благодаря конформационным изменениям мономеров актина, необходимым для нуклеации полимеризации [12]. Однако в спермиях жеребца глицерол даже в незначительных концентрациях вызывал деполимеризацию актина [13].

Увеличение содержания белковой фракции, расположенной между полосами 5 и 6, в профиле теней эритроцитов, инкубированных с КПА, может быть связано с повышением взаимодействий между низкомолекулярными полипептидами при изменении активности воды в присутствии КПА. В таких условиях вероятность образования полипептидного комплекса с незначительным молекулярным весом под влиянием диамида выше в эритроцитах, инкубируемых с КПА, по сравнению с контролем. Однако нельзя исключить, что образование данной фракции может быть обусловлено включением цитозольных белков [14], которые

связываются с МЦК в результате регуляторных изменений их структуры или появления дополнительных мест связывания при реагировании белков с диамидом. Очевидно, под влиянием КПА такие изменения в белках МЦК происходят более активно.

Представленные результаты создают видимость одинаковой реакции белков МЦК эритроцитов на КПА разного типа действия, растворы которых, к тому же, отличаются друг от друга своими физико-химическими свойствами. Однако следует помнить, что оцениваемые пространственно-конформационные модификации белков, связанные с изменением локализации –SH-групп, представляют собой лишь один из многих возможных вариантов модификации макромолекул, объединённых в систему МЦК. В действительности функциональные свойства мембраны эритроцитов под влиянием разных КПА могут меняться неодинаково. В частности, разные КПА продемонстрировали неодинаковую степень влияния на механическую устойчивость эритроцитов [15], которая в значительной степени определяется состоянием белков МЦК.

Действие КПА, являющихся амфифильными веществами, на белки может быть реализовано различными способами и зависит от особенностей взаимодействия между компонентами системы “вода – КПА – биомacroмолекула (биомикроповерхность)”. Стабилизирующее действие КПА, как правило, связывают с формированием преимущественно неблагоприятных взаимодействий с макромолекулами, в частности, благодаря стерическому исключению КПА от поверхности белков [16], в то время как преимущественное взаимодействие КПА с биокомпонентами способствует их дестабилизации. Однако это правило работает далеко не всегда. Так, глицерол и ПЭГ по-разному ведут себя в отношении различных химических групп, представленных на биомикроповерхностях [17]. Для глицерола характерно формирование преимущественно неблагоприятных взаимодействий, в то время как ПЭГ через внутренние группы своей полимерной цепи может благоприятно взаимодействовать с отдельными атомами на поверхности биомacroмолекул. Поэтому в условиях осмотического сжатия клеток ПЭГ, по-видимому, может инициировать нарушения структуры белков. Однако на примере карбоангидразы В показано [18], что ПЭГ, напротив, способствует ускорению рефолдинга белка, демонстрируя положительный эффект на белковую структуру.

Очевидно, исключение и контактное взаимодействие КПА с поверхностью белка могут присутствовать как в стабилизирующих, так и в дестабилизирующих взаимодействиях, и ни один из этих эффектов не может быть исключён [19] в качестве механизмов влияния КПА на биообъект. В зависимости от структурных характеристик макромолекул и физико-химических свойств КПА баланс между исключением и контактным взаимодействием может меняться.

Описанные механизмы характерны для КПА обоих типов, поскольку даже экзоцеллюлярные вещества могут действовать таким образом на те части макромолекул, которые экспонированы на внешней стороне мембраны. Кроме того, влияние КПА на белки может дополняться эффектом краудинга [20], что в большей степени касается экзоцеллюлярных КПА. Снижение содержания воды в клетках в гипертонических растворах экзоцеллюлярных соединений приводит к увеличению вязкости, изменению динамики воды, повышению ионной силы или изменению состава ионов в цитозоле, что, в конечном итоге, может влиять на структурную стабильность различных клеточных компонентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действие КПА эндо- и экзоцеллюлярного типов на белки МЦК может быть сложным и неоднозначным. Тем не менее, исследованные КПА не вызвали изменений полипептидного состава теней эритроцитов, что подтверждено данными SDS-ПААГ-электрофореза с применением β-меркаптоэтанола. Более детальный анализ влияния КПА на белки МЦК с применением диамида также не выявил структурных нарушений, которые приводили бы к значительным изменениям локализации –SH-групп белков и повышению их доступности к “сшивающему” действию диамида в сравнении с контрольными параметрами. Вместе с тем, изменения электрофоретической подвижности белков в зоне полосы 5 указывают на реорганизацию структурного состояния актиновых протофиламентов, которые могут быть связаны с изменениями самих актиновых мономеров или инициироваться различными актин-связывающими белками в присутствии КПА. Несмотря на определённую схожесть проявлений перестроек в зоне актиновых протофиламентов при экспонировании эритроцитов в растворах разных КПА, механические свойства клеток, которые определяются, прежде всего, свойствами МЦК, могут различаться [15], что обусловлено, очевидно, более тонкими изменениями в структуре макромолекул, не связанными с изменениями локализации –SH-групп белков. Использованный в данной работе метод оценки модификации белков в присутствии КПА охватывает далеко не все их возможные проявления. В частности, не известны регуляторные последствия включения сигнальных систем в модификации взаимодействий между отдельными парами белков или белками, входящими в систему макрокомплексов [9]. Предпосылки таких изменений могут быть связаны с влиянием отдельных КПА на уровень внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [21, 22]. Поэтому очевидна необходимость более детальных исследований модификаций белков МЦК эритроцитов под влиянием КПА, что позволит определить пути биохимической стабилизации субклеточных элементов и совершенствовать методы криоконсервирования клеток крови.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования НИР №2.2.6.90 (госрегистрация № 0114U0011320) Национальной Академии Наук Украины.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании на крови людей, соответствуют этическими стандартами институционального и национального комитета по исследовательской этике, а также Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Scott K.L., Lecak J., Acker J.P. (2005) *Transfus. Med. Rev.*, **19**, 127-142.
2. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. (2019) Биологические Мембраны, **36**(2), 125-136. [Zemlianskykh N.G., Babijchuk L.A. (2019) *Biologicheskyye Membrany*, **36**(2), 125-136.]
3. Землянских Н.Г., Денисова О.Н. (2009) *Биофизика*, **54**(4), 693-703. [Zemlianskykh N.G., Denisova O.N. (2009) *Biophysics*, **54**(4), 490-496.]
4. Фалько О.В., Землянских Н.Г., Липина О.В., Прокопюк О.С. (2013) *Биомедицинская химия*, **59**(2), 219-234. [Falco O.V., Zemlianskykh N.G., Lipina O.V., Prokopyuk O.S. (2013) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **59**(2), 219-234.]
5. Ragoonanan V., Less R., Aksan A. (2013) *Cryobiology*, **66**(2), 96-104.
6. Землянских Н.Г. (2016) *Цитология и генетика*, **50**(3), 66-79. [Zemlianskykh N.G. (2016) *Tsitologiya i Genetika*, **50**(3), 66-79.]
7. Chiou S., Vesely D.L. (1995) *Life Sci.*, **57**(10), 945-955.
8. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.
9. Lux 4th. S.E. (2016) *Blood*, **127**, 187-199.
10. Sharma S., Punjabi V., Zingde S.M., Gokhale S.M. (2014) *J. Membr. Biol.*, **247**(11), 1181-1189.
11. Fedorova M., Kuleva N., Hoffmann R. (2010) *J. Proteome Res.*, **9**, 1598-1609.
12. Pajot-Augy E., Axelos M.A.V. (1992) *Eur. Biophys. J.*, **21**, 179-184.
13. Macías García B., Ortega Ferrusola C., Aparicio I.M., Miró-Morán A., Morillo Rodríguez A., Gallardo Bolaños J.M., González Fernández L., Balao da Silva C.M., Rodríguez Martínez H., Tapia J.A., Peña F.J. (2012) *Theriogenology*, **77**(7), 1280-1289.
14. Pasini E.M., Kirkegaard M., Mortensen P., Lutz H.U., Thomas A.W., Mann M. (2006) *Blood*, **108**, 791-801.
15. Землянских Н.Г. (2018) *Биофизика*, **63**(1), 94-105. [Zemlianskykh N.G. (2018) *Biophysics*, **63**(1), 66-76.]
16. Timasheff S.N. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 67-97.

17. Knowles D.B., Shkel I.A., Phan N.M., Sternke M., Lingeman E., Cheng X., Cheng L., O'Connor K., Record M.T. (2015) *Biochemistry*, **54**, 3528-3542.
18. Cleland J.L., Hedgepeth C., Wang D.I. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 13327-13334. PMID:1618834
19. Schellman J.A. (2003) *Biophys. J.*, **85**(1), 108-125.
20. Rosin C., Schummel P.H., Winter R. (2015) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**(13), 8330-8337.
21. Kofanova O.A., Zemlyanskikh N.G., Ivanova L., Bernhardt I. (2008) *Bioelectrochemistry*, **73**, 151-154.
22. Kucherenko Y.V., Bernhardt I. (2006) *Ukr. Biokhim. Zh.*, **78**(6), 46-52. PMID:18959037

Поступила в редакцию: 02. 04. 2020.  
 После доработки: 24. 11. 2020.  
 Принята к печати: 01. 12. 2020.

## THE EFFECT OF CRYOPROTECTIVE AGENTS ON PROTEINS OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE-CYTOSKELETON COMPLEX

*N.G. Zemlianskykh*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
23 Pereyaslavskaya str., Kharkov, 61016 Ukraine; e-mail: nzemliansky@gmail.com

The aim of the study was to evaluate of the effects of glycerol and DMSO, belonging to the endocellular type of cryoprotective agents (CPAs), as well as polyethylene glycol, dextran, sucrose, and mannitol, related to exocellular CPAs, on proteins of the membrane-cytoskeleton complex (MCC) of human erythrocytes at the stage preceding freezing. The assessment of protein modifications was performed by SDS-PAGE using different approaches when preparing samples for analysis. The use of  $\beta$ -mercaptoethanol in the solubilizing buffer showed no changes in the MCC polypeptide profile of erythrocytes preincubated with CPAs thus suggesting good biocompatibility of the studied substances. The use of the cross-linking reagent diamide for assessment of protein modifications did not reveal structural abnormalities that would result in significant changes in the localization of  $-SH$  groups and an increase in the production of high-molecular-weight polypeptide complexes identified by SDS-PAGE without  $\beta$ -mercaptoethanol. However, the recognized changes in the electrophoretic mobility of proteins in the area of band 5 in erythrocytes incubated with CPA in the presence of diamide suggest a reorganization of the structural state of actin protofilaments, which can be caused by alterations of actin monomers themselves or initiated by modifications of actin-binding proteins in the presence of CPAs. In addition, an increase in the amount of the protein fraction located between bands 5 and 6 in the MCC profiles of erythrocytes incubated with CPA and diamide was revealed. Despite the similarity of the reaction of erythrocyte proteins to different CPAs, the properties of cells depending on MCC, may differ due to modifications in the macromolecule structures, which are not associated with changes in the localization of the  $-SH$ -groups of proteins. The results obtained indicate that CPAs may have a significant impact on the erythrocyte MCC, and this requires further research.

**Key words:** erythrocyte; membrane; cytoskeleton; protein; cryoprotective agents; cryoconservation

**Funding.** The study was carried out within the framework of the budgetary financing of research work No. 2.2.6.90 (state registration No. 0114U0011320) of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Received: 02.04.2020, revised: 24.11.2020, accepted: 01.12.2020.