

## ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МЕХАНИЧЕСКУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ И ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2018 г. Н.Г. Землянских

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61016, Харьков, ул. Переяславская, 23, Украина*

*E-mail: nzemliansky@gmail.com*

Поступила в редакцию 27.02.17 г.

Изучено влияние сахарозы, декстрана, полиэтиленгликоля, глицерола и маннитола, обладающих криопротекторными свойствами разной степени выраженности, на механическую устойчивость и геометрические параметры эритроцитов человека. Все вещества, за исключением маннитола, способствовали снижению гемолиза, вызванному перемещением мелких шариков. Глицерол и полиэтиленгликоль, обеспечивающие самый высокий уровень защиты эритроцитов при криоконсервировании, продемонстрировали максимальную эффективность и при механическом стрессе. Изменения устойчивости клеток, возможно, связаны с трансформацией их геометрических параметров. По данным цитометрии 5% растворы всех веществ, за исключением маннитола, вызывали сходные изменения геометрических параметров клеток. Реализация взаимосвязи между изменениями механической устойчивости и геометрических параметров эритроцитов под влиянием криопротекторных агентов может быть обусловлена модификацией белков мембрано-цитоскелетного комплекса, контролирующего механоэластические свойства и морфологию эритроцитов.

*Ключевые слова: эритроцит, мембрана, механический стресс, криопротекторы, цитометрия.*

Ингибирование биохимических реакций при ультранизких температурах позволяет клеткам сохранять структурные и функциональные свойства в течение долгого времени. Однако в процессе криоконсервирования на клетки действует целый ряд негативных факторов, включающих: образование кристаллов при переходе жидкой фазы в твердое состояние; рост концентрации солей и повышение осмотического давления в переохлажденной жидкости; дегидратацию макромолекул; фазовые переходы липидов мембран [1]; перекисное окисление, индуцированное потерей активности дисмутазы [2]; ионные и электрические эффекты, связанные с внедрением некоторых типов ионов в кристаллы льда [3].

Существенную роль в повреждении клеточных структур при криоконсервировании может играть механический стресс, вызванный формированием внеклеточных кристаллов льда или взаимодействием клеток между собой и стенками контейнера [4–6]. В частности, механические повреждения эритроцитов, приводящие к гемолизу, наблюдались при замораживании в глицеролсодержащем растворе в присутствии

антифризных белков, индуцировавших формирование мелких кристаллов льда [7]. Разрушение клеток было вызвано сильной деформацией плазматических мембран кристаллами, несмотря на присутствие в среде криопротекторного агента, способного эффективно защищать клетки в обычных условиях. Другой аспект влияния механических факторов на формирование повреждений, обусловленный сдавливанием клеток в процессе замораживания, также имеет экспериментальные подтверждения [8]. Замораживание образцов спермы в присутствии стеклянных шариков различных диаметров показало, что существует прямая связь между суммарной площадью поверхности, образованной присутствующими в контейнере шариками, и степенью повреждения клеток. Кроме того, при изучении эффекта упаковки клеток (путем их разведения средой) на формирование структурных нарушений при замораживании в присутствии шариков было установлено, что с увеличением отношения площади поверхности к объему давление внутри контейнера во время замораживания увеличивается и коррелирует с ростом повреждения клеток [8].

Для защиты клеток от неблагоприятных факторов при криоконсервировании применяют криопротекторные агенты, относящиеся к раз-

Сокращения: ПЭГ – полиэтиленгликоль, FSC – прямое фотосечение.

личным классам органических соединений. При замораживании эритроцитов человека используют в основном эндоцеллюлярный криопротектор глицерол [9–11], который легко проникает через плазматическую мембрану [12]. Однако для сохранения осмотической стабильности клеток в физиологических условиях его необходимо отмывать из размороженных клеточных суспензий. Отмывка криопротекторного агента является длительной и трудоемкой процедурой. Решение данной проблемы связывают с разработкой безотмывочных методов криоконсервирования с применением экзоцеллюлярных (не проникающих через мембрану) криопротекторов, которые позволяют использовать клетки без удаления защитных соединений при условии их низкой токсичности [13–16]. Поэтому такие вещества, как сахароза, маннитол, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилпирролидон, гидроксипропилкрахмал и декстран, активно исследуются в качестве перспективных криопротекторов. Следует отметить, что криопротекторные свойства разных соединений избирательно проявляются в зависимости от типа клеток. Глицерол и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 Да (ПЭГ-1500) обеспечивают самый высокий уровень сохранности эритроцитов человека после размораживания [9,10,17]. Тем не менее сравнительные исследования криопротекторов, обладающих разными уровнями защитной эффективности в отношении различных типов клеток, могут быть полезными для выявления общих закономерностей модификации субклеточных систем, определяющих стабилизацию клеток к действию стрессовых факторов криоконсервирования.

Известно, что криопротекторные вещества влияют на активность систем мембранного транспорта [18–21], а также способствуют структурным изменениям мембранных липидов [22, 23] и белков цитоскелета [24,25]. В результате структурно-функциональных модификаций отдельных субклеточных систем под влиянием криопротекторных агентов могут происходить изменения геометрических параметров клеток и, возможно, физических свойств плазматических мембран, в частности, механической стабильности и деформируемости эритроцитов. Связь физических свойств мембран эритроцитов с изменениями формы и объема клеток подтверждается в исследованиях различных патологий, обусловленных дефектами структуры белков мембрано-цитоскелетного комплекса, при которых отмечается трансформация дискоидной формы эритроцитов и изменение механикоэластических свойств мембраны [26]. Важно отметить, что эритроциты в физиологических

условиях постоянно подвергаются механическому (сдвиговому) стрессу, проходя через узкие капилляры, размеры которых меньше размеров самих эритроцитов [27]. Тем не менее это не влечет за собой каких-либо повреждений, поскольку физические характеристики мембраны гарантируют стабильность эритроцитов. Однако в условиях, когда внешние стрессовые воздействия превышают критические значения механической стабильности, клетки подвергаются гемолизу [28,29]. Учитывая, что механический фактор является одним из элементов повреждения клеток при низких температурах, можно допустить, что изменения механических свойств мембран под влиянием криопротекторных веществ вносят существенный вклад в повышение выживаемости клеток в стрессовых условиях криоконсервирования. Кроме того, изменения механической устойчивости эритроцитов при введении криопротекторов в состав клеточных суспензий могут быть связаны с особенностями модификации геометрических параметров клеток. Взаимосвязь между изменениями механических свойств и геометрических параметров эритроцитов, предположительно, реализуется через влияние криопротекторных веществ на структурное состояние или взаимодействия между белками мембрано-цитоскелетного комплекса, который контролирует и опосредует регуляцию различных физиологических процессов в эритроцитах.

Цель данного исследования заключалась в изучении влияния криопротекторных веществ маннитола, сахарозы, декстрана, ПЭГ-1500 и глицерола на развитие гемолитических повреждений эритроцитов при механическом стрессе и изменение геометрических параметров клеток в их присутствии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие реактивы: трис, сахарозу (Sigma, США); ПЭГ-1500, декстран с молекулярной массой 40000 Да, глюкозу (Fluka, США); маннитол, глицерол, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, и CaCl<sub>2</sub> и другие реактивы производства России и Украины (квалификации х.ч. или ос.ч.).

Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, заготовленной с использованием глюкозо-цитратного раствора в Центре службы крови г. Харькова. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1200 g в течение 10 мин при комнатной температуре, удаляли плазму и лейкоцитарные компоненты крови. Затем к осажденным эритроцитам добавляли среду А (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4)

в объеме, пяти–семикратно превышающем объем клеточной массы, и отмывали от остатков плазмы и белых клеток трехкратным центрифугированием в аналогичном режиме.

Устойчивость эритроцитов к механическому стрессу оценивали по уровню гемолиза под влиянием перемещающихся в суспензии мелких шариков [30]. Отмытые эритроциты (1 мл) соединяли с растворами криопротекторных веществ (5 мл) в пластиковых стаканчиках объемом 20 мл (высота – 4 см, диаметр – 3 см) (конечный гематокрит примерно 15%). Растворы маннитола, глицерола, сахарозы, ПЭГ-1500 и декстрана были приготовлены на основе среды А в концентрациях 5–20%. Затем в стаканчики осторожно вносили пластиковые шарики (диаметр 5 мм, вес 1,5 г) в количестве 50 штук и магнитную палочку. Суспензию эритроцитов с пластиковыми шариками перемешивали на магнитной мешалке ММ-5 при скорости 1200 об/мин в течение 1 ч. Для определения гемолитических повреждений клеток из суспензии эритроцитов отбирали аликвоты, центрифугировали при 1200 g и отбирали супернатант. Гемолиз определяли методом спектрофотометрии (спектрофотометр СФ-4А, Россия) с проточной кюветой при  $\lambda = 543$  нм по количеству вышедшего из клеток гемоглобина. Количество гемоглобина выражали в процентах по отношению к 100% гемолизу эритроцитов в присутствии 0,1% детергента тритона X-100.

Геометрические параметры клеток определяли методом проточной цитометрии по данным распределения клеточных субпопуляций в соответствии с показаниями прямого светорассеивания при длине волны аргонового лазера 488 нм на приборе FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Эритроциты инкубировали в течение 30 мин при 37°C в исследуемых растворах с разведением до концентрации порядка  $10^7$  клеток/мл. Контрольные образцы эритроцитов инкубировали в модифицированной Рингер-глюкозной среде: 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, мМ, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 32 мМ HEPES (pH 7,4), 5 мМ глюкозы. Перед измерением клеточные суспензии разводили в соответствующих растворах до концентрации порядка  $10^6$  клеток/мл. При каждом измерении просчитывали 30000 событий. Обработка экспериментальных данных выполнена с помощью программы WinMDI 2.8.

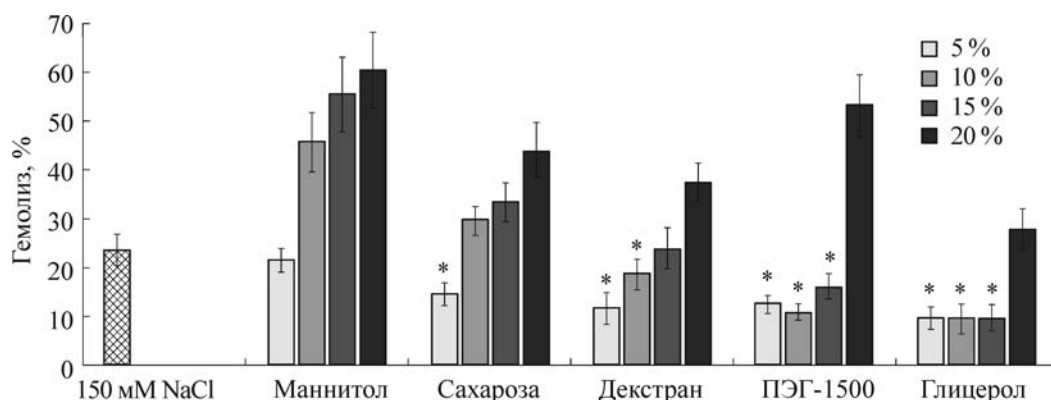
Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программного пакета Statgraphics plus 2.1. Данные представлены в виде  $M \pm SE$  (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценива-

ли с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименьшей значимой разницей. В каждой серии проведено не менее шести опытов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Растворы криопротекторных веществ, сбалансированных по ионной силе и pH на уровне физиологических значений, по-разному влияли на устойчивость эритроцитов в условиях механического стресса (рис. 1). Прежде всего, следует отметить отличие маннитола от всех исследованных веществ, поскольку его действие было направлено преимущественно на дестабилизацию эритроцитов, за исключением 5%-й концентрации, при которой его влияние было нейтральным. Эффективность защитного действия других соединений – сахарозы, декстрана, ПЭГ-1500 и глицерола – зависела от их концентрации. В данной группе веществ сахароза оказалась наименее эффективной, поскольку стабилизация клеток при механическом стрессе была выявлена только при 5%-й концентрации. Декстран повышал устойчивость эритроцитов в большем концентрационном диапазоне (5–10%), а глицерол и ПЭГ-1500 продемонстрировали максимальную эффективность (5–15%). Тем не менее дальнейшее повышение концентрации глицерола и ПЭГ-1500 выявило определенные отличия в их влиянии на физические свойства мембран, поскольку действие последнего характеризовалось резким повышением гемолиза эритроцитов в условиях механического стресса, в отличие от глицерола.

Введение гипертонических растворов криопротекторных веществ в суспензию эритроцитов приводит к выходу воды из клеток с последующим перераспределением ионов и/или самих криопротекторных веществ между вне- и внутриклеточной средой, что соответствующим образом влияет на объем клеток. Изменения геометрических параметров эритроцитов, экспонированных в гипертонических растворах, определяются не только объемом, но и формой клеток, поскольку под влиянием криопротекторных веществ дискоциты могут трансформироваться в стоматоцитарном и эхиноцитарном направлениях [31,32]. Кроме того, следует принять во внимание тот факт, что в норме эритроциты представлены различными субпопуляциями, демонстрирующими значительную вариабельность целого ряда параметров, в том числе объема, площади поверхности и деформируемости [33–35], поэтому одно и то же воздействие может быть по-разному реализовано клетками, относящимися к разным субпопуля-



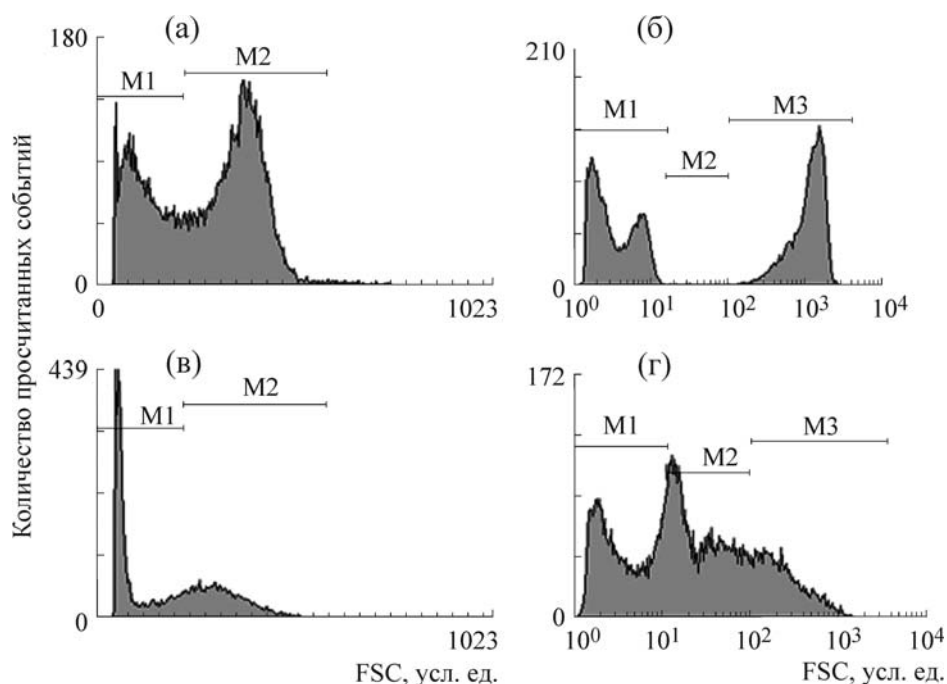
**Рис. 1.** Гемолитическое повреждение эритроцитов человека при механическом стрессе в присутствии 5–20%-х растворов криопротекторных веществ. \* – Снижение гемолиза относительно контроля (150 мМ NaCl),  $P < 0,05$ .

циям. Важно также учитывать тот факт, что криопротекторы, принадлежащие к разным классам химических соединений, могут по-разному влиять на работу систем активного транспорта и проницаемость ионов через плазматическую мембрану [19,21,36], что, в свою очередь, существенно влияет на осмотическое поведение клеток. В связи с вышеизложенным становится очевидной невозможность априори оценить, насколько изменится объем клеток под влиянием различных эндо- и экзоцеллюлярных соединений, даже в условиях, когда осмотическое давление растворов будет одинаковым. К тому же деформации клеток, возникающие вследствие изменений объема и формы эритроцитов в гипертонических растворах, могут неодинаково проявляться для клеток, относящихся к разным клеточным субпопуляциям. Для оценки изменений физических характеристик большого числа клеток лучше всего подходит метод проточной цитометрии, позволяющий анализировать индивидуальные физические характеристики нескольких тысяч клеток в гетерогенной клеточной суспензии при одном измерении и получить информацию о размере клеток по сигналу прямого светорассеяния (в направлении лазерного луча). Известно, что движение жидкости в капилляре заставляет эритроциты вращаться, вследствие чего детекторы фиксируют разные проекции диска [37], что определяет бимодальное распределение клеток на гистограммах (рис. 2а). Оценка геометрических параметров традиционно выполняется в линейной форме. Однако на примере исследования изменений распределения клеток, экспонированных в гипертоническом растворе NaCl, можно убедиться, что логарифмический вид анализа позволяет более четко оценивать изменения геометрических параметров клеток, происходящих при контакте с неизотоническим раствором

(рис. 2в, г). Кроме того, при логарифмическом анализе эритроциты, инкубируемые в среде Рингера (контроль), четко распределяются в пределах двух зон (рис. 2б), соответствующих маркерам М1 и М3, которые отражают поперечную и фронтальную ориентацию дисковых клеток в потоке, в отличие от линейного типа анализа данных, для которого характерно перекрытие пиков гистограмм (рис. 2а).

Изменения геометрии эритроцитов под влиянием криопротекторных веществ характеризуются двумя параметрами – количеством клеток в каждой зоне и значением медианы гистограммы распределения, показывающей величину, относительно которой клетки в выделенной зоне разделены на две равные по численности части. Добавление в суспензию эритроцитов криопротекторных веществ приводит к перераспределению клеток между зонами в соответствии с их характеристиками.

Изменения геометрических параметров эритроцитов под влиянием криопротекторных агентов являются концентрационно-зависимыми. В целом для всех исследованных растворов отмечалось снижение количества клеток (табл. 1) и значения медианы (табл. 2) в зоне М3. В зоне М1 также наблюдалось снижение количества клеток практически для всех исследованных растворов, за исключением маннитола (5 и 20%) и декстрана (20%). Таким образом, общая тенденция в перераспределении клеток между зонами М1, М2 и М3, границы которых установлены на основании распределения клеток в контрольной среде (рис. 2б), заключалась в снижении количества клеток в зонах М1 и М3 с одновременным увеличением доли клеток в зоне М2. Такая тенденция говорит об изменении геометрических пропорций значительного числа эритроцитов в направлении уменьшения фронтальных и увеличения поперечных раз-



**Рис. 2.** Гистограммы распределения эритроцитов, экспонированных при 37°C в среде Рингера (контроль) (а,б) и 0,5 М NaCl (в,г) по показателям прямого светорассеивания (FSC). Измерения проведены в линейном (а,в) и логарифмическом диапазонах (б, г). Шкала X представляет показатели прямого светорассеивания (FSC), (усл. ед.). Шкала Y представляет количество просчитанных событий. Представлены данные типичного эксперимента.

меров диска, что возможно за счет образования стоматоцито- и эхиоцитоподобных форм или сферификации. Кроме того, изменение геометрических параметров эритроцитов при экспонировании в гипертонических растворах экзоцеллюлярных веществ может быть связано с

их осмотическим сжатием, на что указывает уменьшение значения медианы в зоне М3. В отношении гистограмм клеток, экспонированных с глицеролом, следует заметить, что наблюдаемые перераспределения отражают, прежде всего, изменения геометрических пропор-

**Таблица 1.** Перераспределение популяций эритроцитов между зонами М1–М3 под влиянием криопротекторных веществ по данным проточной цитометрии (FSC) ( $M \pm SE$ )

Растворы	Количество клеток, %		
	М1	М2	М3
Среда Рингера	53,8 ± 2,8	2,5 ± 0,6	43,8 ± 3,1
Маннитол, 5 %	62,3 ± 3,2*	30,9 ± 3,2	6,8 ± 0,5*
Маннитол, 20 %	57,8 ± 0,7*	37,8 ± 1,0	4,4 ± 0,1*
Сахароза, 5 %	32,7 ± 2,9*	45,2 ± 2,3	22,8 ± 2,3*
Сахароза, 20 %	37,3 ± 2,0*	46,4 ± 1,4	17,23 ± 1,4*
Декстран, 5 %	39,7 ± 3,8*	42,5 ± 2,2	18,5 ± 2,6*
Декстран, 20 %	55,4 ± 5,2	36,7 ± 4,0	8,5 ± 1,7*
ПЭГ-1500, 5 %	36,2 ± 2,8*	43,3 ± 1,5	21,1 ± 2,1*
ПЭГ-1500, 20 %	41,2 ± 3,5*	46,0 ± 2,1	13,6 ± 2,0*
Глицерол, 5 %	36,9 ± 3,0*	44,0 ± 2,1	20,0 ± 2,0*
Глицерол, 20 %	38,7 ± 2,1*	43,1 ± 1,9	19,1 ± 2,2*

Примечание. \* –  $P < 0,5$  относительно контроля (среда Рингера).

**Таблица 2.** Значения медиан гистограмм распределения эритроцитов, экспонированных в присутствии криопротекторных веществ, по данным проточной цитометрии (FSC) ( $M \pm SE$ )

Растворы	Значения медиан гистограмм, усл. ед.		
	M1	M2	M3
Среда Рингера	4,1 ± 0,5	–	1323,5 ± 44,4
Маннитол, 5 %	6,9 ± 0,4*	38,5 ± 1,3	959,3 ± 26,0*
Маннитол, 20 %	7,1 ± 0,4*	43,2 ± 0,7	854,1 ± 67,2*
Сахароза, 5 %	5,0 ± 0,4	63,3 ± 4,4	838,0 ± 96,6*
Сахароза, 20 %	4,3 ± 0,3	81,7 ± 3,8	289,8 ± 13,1*
Декстран, 5 %	4,8 ± 0,2	48,8 ± 3,0	1286,7 ± 30,0*
Декстран, 20 %	4,5 ± 0,2	40,7 ± 2,5	955,2 ± 125,1*
ПЭГ-1500, 5 %	4,8 ± 0,1	54,0 ± 2,7	977,2 ± 65,1*
ПЭГ-1500, 20 %	4,3 ± 0,2	72,0 ± 5,0	365,6 ± 46,7*
Глицерол, 5 %	4,8 ± 0,3	70,6 ± 8,5	817,0 ± 164,8*
Глицерол, 20 %	4,1 ± 0,1	90,4 ± 7,9	458,3 ± 104,8*

Примечание. \* –  $P < 0,5$  относительно контроля (среда Рингера).

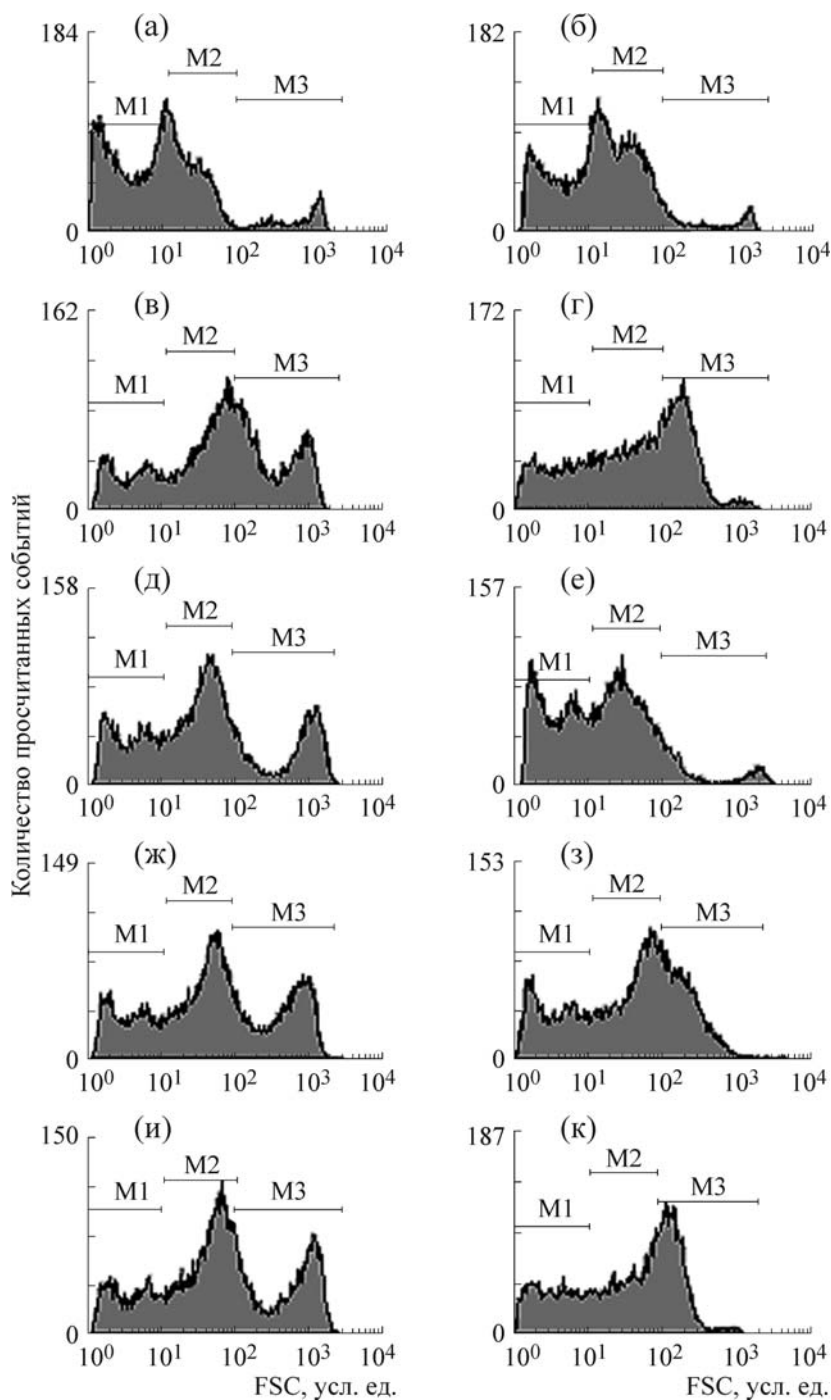
ций клеток, а не изменение объема, поскольку данный криопротекторный агент проникает в клетки в обмен на внутриклеточную воду, вследствие чего существенного изменения объема клеток не происходит.

Из всех исследованных криопротекторных веществ необходимо особо выделить маннитол, который характеризуется отличным от общих тенденций изменением геометрических параметров эритроцитов, демонстрируя повышение количества эритроцитов (табл. 2) и увеличение значения медианы (табл. 2) в зоне M1 при резком снижении количества клеток в зоне M3, что может свидетельствовать о резком уменьшении объема клеток и, возможно, тенденции к сферификации значительного числа эритроцитов.

Принимая во внимание особенности количественного распределения клеток между зонами M1, M2 и M3 и изменения значений медиан в зонах M1 и M3, можно отметить, что 5%-е растворы сахарозы, декстрана, ПЭГ-1500 и глицерола, демонстрирующие способность к стабилизации эритроцитов при механическом стрессе, действительно имеют близкие характеристики (табл. 1, 2; рис. 3). В то же время эритроциты, экспонированные в 20%-х растворах данных криопротекторных агентов, имеют ряд индивидуальных особенностей гистограмм распределения. Прежде всего это касается декстрана, для которого с ростом концентрации характерно увеличение количества клеток в зоне M1 и резкое снижение в зоне M3, в то время как значение медианы для зоны M3 слабо изменяется в сравнении с изменениями, вызван-

ными другими криопротекторами. Такое перераспределение геометрических параметров клеток может свидетельствовать об уплощении дискоцитов при резком их обезвоживании, обусловленном высоким осмотическим давлением 20%-го раствора декстрана. Эритроциты, экспонированные в 20%-х растворах сахарозы, ПЭГ-1500 и глицерола, имеют определенное сходство в количественном распределении клеток между зонами M1, M2 и M3, но все же отличаются по значениям медиан в зоне M3. Резкое снижение значений медиан в зоне M3 в присутствии сахарозы и ПЭГ-1500 указывает на обезвоживание эритроцитов в данных гипертонических растворах, что может быть причиной утраты ими стабилизирующего действия при механическом стрессе. Изменения геометрических параметров эритроцитов в присутствии 20%-го глицерола, несмотря на кажущееся сходство с 20%-ми сахарозой и ПЭГ-1500, имеют иной механизм, связанный со способностью глицерола проникать через мембрану эритроцитов человека, поэтому объяснение потери им способности стабилизировать эритроциты при механическом стрессе требует дополнительной информации.

Таким образом, прослеживается определенная корреляция между характером изменений геометрических параметров клеток и модификацией физических свойств мембраны эритроцитов под влиянием криопротекторных веществ. Маннитол, оказывающий преимущественно дестабилизирующее действие на эритроциты, отличается от всех исследованных ве-



**Рис. 3.** Перераспределение популяций эритроцитов между зонами M1 – M3 по данным прямого светорассеивания (FSC) под влиянием криопротекторных веществ. Левая панель представляет гистограммы эритроцитов, экспонированных в присутствии 5%-х растворов криопротекторных веществ, правая панель – гистограммы эритроцитов, экспонированных в присутствии 20%-х растворов криопротекторных веществ (а, б – маннитол; в, г – сахараза; д, е – декстран; ж, з – ПЭГ; и, к – глицерол). Границы зон M1–M3 установлены на основании распределения клеток в контрольной среде (рис. 2б). Обозначения осей аналогичны рис. 2. Представлены данные типичного эксперимента.

рядом особенностей гистограмм распределения геометрических характеристик эритроцитов по показателям прямого светорассеивания проточной цитометрии.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследованные криопротекторные вещества относятся к так называемым «совместимым»

косольвентам, которые способны поддерживать структуру белковых макромолекул, мембран и клеток в состоянии, близком к нативному, не вызывая денатурации или разрушения структурного порядка [38–40]. Тем не менее физико-химические свойства среды в присутствии криопротекторов существенно отличаются от физиологических характеристик, что индуцирует структурные и функциональные изменения различных субклеточных систем. Результатом таких комплексных изменений может быть модификация физических свойств плазматических мембран. Повышение устойчивости эритроцитов к механическому стрессу под влиянием сахарозы, декстрана, ПЭГ и глицерола является, по-видимому, результатом модификации многих компонентов мембраны и цитоскелетной сети, связанных точечными контактами в единую систему. Вместе с тем можно допустить, что способность исследованных растворов криопротекторных веществ, сбалансированных по ионной силе и рН на уровне физиологических значений, стабилизировать эритроциты при механическом стрессе связана с влиянием самих физико-химических факторов среды на характеристики генерируемого стресса. В частности, повышение вязкости растворов может быть одним из факторов, способствующих смягчению степени механического воздействия подвижных шариков на эритроциты. Однако данное предположение не находит подтверждения при детальном рассмотрении. Вязкости растворов маннитола, сахарозы и глицерола в концентрационном диапазоне 5–15% [41–43] сходны между собой, тем не менее, маннитол не оказывает стабилизирующего действия на эритроциты, сахароза быстро утрачивает свой эффект, а глицерол демонстрирует максимальную эффективность. Кроме того, не существует каких-либо закономерностей, связывающих повышение устойчивости эритроцитов к механическому стрессу с предельными границами вязкости растворов. К примеру, сахароза утрачивает стабилизирующее действие при концентрации 10% с вязкостью 1,05 сП [42], а 10%-й декстран с вязкостью порядка 4,5 сП [44] все еще проявляет защитное действие и перестает стабилизировать эритроциты только при концентрации 15% с вязкостью примерно 10 сП [44]. Данные факты указывают на то, что вязкость среды не является определяющим условием стабилизации клеток при механическом стрессе. Аналогичное заключение было сделано при определении влияния компонентов плазмы и декстрана на устойчивость эритроцитов человека при механическом воздействии, вызванном перемещением стеклянных шариков в суспензии клеток на протяжении

18 ч, когда было показано, что относительная вязкость растворов плохо коррелирует с защитой от механического стресса [45]. Доказательством того, что вязкость среды не является определяющим элементом в изменении устойчивости клеток при механическом стрессе, получены также при исследовании растворов ПЭГ (м.м. 20000) и декстрана (м.м. 40000) в качестве веществ, способствующих уменьшению повреждений эритроцитов при гемоделиции. На модели эритроцитов быка продемонстрировали преимущество ПЭГ относительно декстрана в снижении гемолиза при механическом воздействии, вызванном подвижными стальными шариками, несмотря на то, что вязкости растворов декстрана и ПЭГ не отличались [46]. Защитный эффект ПЭГ, по мнению авторов, мог быть связан с изменениями физико-химических характеристик поверхностей путем адсорбции ПЭГ на шариках, что делало их более биосовместимыми, и адсорбции на клетках, способствующей понижению чувствительности мембраны к сдвиговому стрессу [46]. Однако данное предположение не может объяснить стабилизацию эритроцитов глицеролом, декстраном и сахарозой в условиях механического стресса, использованного в данной работе.

Предположение, связывающее стабилизацию эритроцитов с осмотическим обезвоживанием клеток в присутствии гипертонических растворов исследуемых веществ, может быть в определенной степени применимо только к сахарозе, ПЭГ и декстрану, которые не проникают через плазматическую мембрану и вызывают сжатие клеток. Однако это не объясняет эффект глицерола, который легко проникает в эритроциты человека и достаточно быстро достигает равновесного распределения между клеткой и средой без существенного изменения объема клеток. Еще более убедительным доказательством того, что стабилизация клеток к механическому стрессу не связана с уменьшением клеточного объема, являются данные по дестабилизации эритроцитов в гипертонических растворах маннитола. Аналогичное заключение было сделано в другой работе [47], где показали на экспериментальной модели механического стресса, вызванного быстрым перешиванием разведенной суспензии эритроцитов с помощью металлической пропеллерной мешалки, что гемолиз не связан с осмотическим механизмом, так как высокие концентрации сахарозы не влияли на данный процесс, в отличие от глутарового альдегида, «сшивающего» мембранные белки и способствующего росту гемолитических повреждений. Представленные факты подтверждают важную роль модификации бел-



ков мембрано-цитоскелетного комплекса в механизме изменения стабильности эритроцитов к механическому стрессу.

В целом механические свойства мембран эритроцитов определяются локальными и нелокальными изгибами бислоя, а также сдвигами и расширением белковой сети цитоскелета, что также может влиять на изменение формы клеток и определять их ответ на различные внешние стрессы, причем функциональная роль цитоскелета проявляется в условиях, когда возникают значительные деформации, угрожающие целостности клетки [48,49]. Изменения геометрических параметров эритроцитов в гипертонических растворах криопротекторных веществ, обусловленные трансформацией формы и размера эритроцитов, могут в определенном смысле рассматриваться как реализация внешнего ответа клеток на изменения структурного состояния или характера взаимодействий между белками мембрано-цитоскелетного комплекса под влиянием криопротекторных агентов. Кроме того, результатом такого рода перестроек в сети мембрано-цитоскелетного комплекса может быть изменение физических свойств мембраны. Важно отметить, что механоэластические свойства мембран, определяющие стабильность и деформируемость клеток, могут изменяться независимо друг от друга, поскольку контролируются различными белок-белковыми взаимодействиями [50]. Реакцией на повышение осмоляльности среды может быть увеличение жесткости мембран эритроцитов [51]. Возможно, изменения механических свойств эритроцитов в присутствии гипертонических растворов криопротекторных веществ также связаны с формированием более жестких мембран, способных выдерживать большие по величине стрессовые напряжения. Следовательно, модификации структурного состояния отдельных белков или взаимодействий между белками мембрано-цитоскелетного комплекса могут определять как изменения физических свойств мембраны под влиянием осмотического фактора, представляющего собой один из элементов влияния растворов криопротекторных веществ на клетки, так и трансформацию геометрических параметров клеток.

Гистограммы распределения геометрических параметров клеток, отражающие генерализованные изменения объема и формы эритроцитов, демонстрируют, что 5%-е концентрации сахарозы, декстрана, ПЭГ-1500 и глицерола, вызывающие повышение механической устойчивости клеток, характеризуются близкими показателями. Это дает весомые основания полагать, что повышение механической стабиль-

ности действительно связано с изменениями геометрических пропорций клеток. По-видимому, такого рода распределение геометрических параметров эритроцитов, обусловленное изначальной неоднородностью свойств субпопуляций в клеточной суспензии [33,34], является оптимальным для повышения механической стабильности клеток.

Примером взаимосвязи изменений формы и физических свойств мембран под влиянием внешнего воздействия могут служить эксперименты с использованием хлорпромазина [52], который индуцирует образование стоматоцитов и вызывает дозозависимое увеличение механической устойчивости мембран. Однако трансформация формы клеток сама по себе не определяет изменение физических свойств мембраны. В частности, оценка механоэластических свойств стоматоцитов, полученных под влиянием хлорпромазина, и эхиноцитов, полученных с использованием салицилата натрия, путем фильтрации через узкие поры показала, что трансформация в стоматоцитарном направлении приводит к увеличению сопротивляемости фильтрации, тогда как в эхиноцитарном – к ее уменьшению [53]. Вместе с тем трансформация дискоцитов в эхиноциты путем истощения АТФ, при которой, в отличие от эхиноцитов, индуцированных салицилатом, увеличивался объем клеток, привела к противоположному результату, т.е. сопровождалась увеличением сопротивления к фильтрации. Следовательно, изменения механоэластических свойств зависят как от трансформации формы, так и от объема клеток [53]. Влияние изменения объема клеток на механоэластические свойства мембран было убедительно продемонстрировано при фильтрации эритроцитов, экспонированных в средах с осмоляльностью в диапазоне 172–665 мОсм/кг  $H_2O$ , через узкие поры [54]. Кроме того, экспонирование эритроцитов в растворах с измененной осмоляльностью влияло не только на фильтруемость клеток, являющуюся своего рода интегральной характеристикой механоэластических свойств мембраны, но и на способность мембран к флуктуациям, которые зависят от состояния цитоскелетной сети [55]. Необходимо также отметить, что в условиях стресса стабильность и деформируемость эритроцитов могут зависеть не только от состояния белков цитоскелета, но и от перераспределения интегральных белков мембраны [56,57]. Такие наблюдения могут свидетельствовать о взаимосвязи изменений геометрических параметров эритроцитов, индуцированных криопротекторами, и модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса, которые лежат в основе

повышения механической стабильности эритроцитов.

Возможно, растворы сахарозы, декстрана, ПЭГ и глицерола, обеспечивающие повышение механической стабильности эритроцитов, способствуют формированию структурно-функционального состояния мембрано-цитоскелетного комплекса, которое достигается путем комбинации незначительных по величине изменений его отдельных элементов. Для каждого вещества вклад модификации тех или иных компонентов в стабилизацию мембраны к механическому стрессу, по-видимому, может отличаться, поэтому увеличение концентрации разных криопротекторных агентов ведет к непропорциональным последствиям в изменении физических свойств мембран эритроцитов. Сходство в распределении геометрических параметров клеток при экспозиции эритроцитов с 5%-ми растворами сахарозы, декстрана, ПЭГ и глицерола указывает на важную роль пропорций клеток (формы и размера) в изменении физических свойств мембраны. Можно допустить, что причиной потери механической стабильности клеток при увеличении концентрации экзоцеллюлярных криопротекторов является чрезмерное обезвоживание клеток в гипертонических растворах, которое вызывает не только потерю свободной воды, но и дегидратацию макромолекул, что ведет к нарушению структурного порядка мембраны. Несмотря на то что способность глицерола проникать в клетки не приводит к обезвоживанию клеток, его высокие концентрации также могут индуцировать дегидратацию макромолекул [58]. Поскольку физико-химические свойства растворов криопротекторов отличаются между собой, степень их дегидратирующего влияния также может иметь разное проявление, что объясняет разные темпы потери ими стабилизирующего действия на клетки в условиях механического стресса. Высказанные предположения в определенной степени находят экспериментальные подтверждения в работе [59], где авторы методами ЯМР и молекулярно-динамического моделирования на примере убиквитина показали варибельность проявлений взаимодействия белка с концентрированными растворами различных веществ, которые приводили к локальным возмущениям поверхности, дегидратации, изменению электростатических характеристик и динамики макромолекулы. Обнаруженные изменения в структуре белковой молекулы зависели от размера и физико-химических свойств растворенных веществ. В частности, было установлено, что небольшие полярные незаряженные молекулы имеют тенденцию «липнуть» к

поверхности белка, в то время как заряженные малые молекулы возмущают внутренние электростатические взаимодействия в белке. Возмущение структуры белка под воздействием веществ, используемых для создания эффекта краудинга (таких как декстран), затрагивает гидрофобные, а не полярные участки на поверхности белковой макромолекулы. Кроме того, было обнаружено, что концентрированные растворы малых по размеру веществ сильно замедляли обмен воды у поверхности белка, в то время как краудинговые вещества не влияли на данный показатель. Приведенные факты подтверждают возможность неспецифической модификации отдельных элементов мембрано-цитоскелетного комплекса под влиянием криопротекторных веществ, которые могут вести к изменениям белок-белковых взаимодействий в сети специфических связей данного комплекса, что отражается на физических свойствах мембран эритроцитов и определяет трансформацию формы клеток.

В заключение можно констатировать, что криопротекторные вещества оказывают существенное влияние на устойчивость эритроцитов человека к механическому стрессу. Стабилизация клеток выявлена при экспонировании с сахарозой, декстраном, ПЭГ-1500 и глицеролом, в то время как маннитол в исследованных концентрациях вызывал преимущественно дестабилизацию. Эффективность защитного действия каждого криопротекторного вещества специфическим образом зависела от его концентрации. Максимальный защитный эффект в отношении эритроцитов человека при механическом стрессе продемонстрировали глицерол и ПЭГ-1500, которые также обеспечивают самый высокий уровень защиты при криоконсервировании данного типа клеток. Очевидно, повышение механической устойчивости клеток в присутствии криопротекторных веществ является одним из элементов механизма защиты клеток в экстремальных условиях, сопутствующих процессам замораживания и отогрева. Способность криопротекторных веществ стабилизировать эритроциты при механическом стрессе может быть связана с изменениями геометрических параметров клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Gao and J. K. Critser, *ILAR J.* **41** (4), 187 (2000).
2. J. G. Alvarez and B. T. Storey, *J. Androl.* **13** (3), 232 (1992).
3. U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Biomembr.* **694** (3), 227 (1982).

4. A. Hubel, T. B. Darr, A. Chang, et al., *Cryobiology* **55** (3), 182 (2007).
5. P. Mazur and K. W. Cole, *Cryobiology* **26** (1), 1 (1989).
6. H. Takamatsu and B. Rubinsky, *Cryobiology* **39** (3), 243 (1999).
7. H. Ishiguro and B. Rubinsky, *Cryobiology* **31** (5), 483 (1994).
8. J. Saragusty, H. Gacitua, I. Rozenboim, et al., *Biotechnol. Bioeng.* **104** (4), 719 (2009).
9. V. Pallotta, G. M. D'Amici, A. D'Alessandro, et al., *Blood Cells Mol. Dis.* **48** (4), 226 (2012).
10. K. L. Scott, J. Lecak, and J. P. Acker, *Transfus. Med. Rev.* **19** (2), 127 (2005).
11. J. W. Lagerberg, *Methods Mol. Biol.* **1257**, 353 (2015).
12. P. Mazur and R. H. Miller, *Cryobiology* **13** (5), 507 (1976).
13. Y. A. Lee, Y. H. Kim, S. J. Ha, et al., *Fertil. Steril.* **101** (4), 1165 (2014).
14. C. Stoll, J. L. Holovati, J. P. Acker, et al., *Biotechnol. Prog.* **28** (2), 364 (2012).
15. M. Feuerecker, I. Kaufmann, A. P. Salam, et al., *CryoLetters* **33** (2), 151 (2012).
16. H. M. El-Shewy, W. F. Jr. Kendal, M. Darrabie, et al., *Cell Transplant.* **13** (3), 237 (2004).
17. Л. А. Бабийчук и Н. Г. Землянских, *Проблемы криобиологии* **1**, 35 (2001).
18. A. Villas-Boas Tribuzy, C. F. Fontes, J. G. Nørby, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **399** (1), 89 (2002).
19. N. G. Zemlyanskikh and O. A. Kofanova, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978154> *Biochemistry (Moscow)* **71** (8), 900 (2006).
20. Н. Г. Землянских и М. В. Хоменко, *Биол. мембраны* **23** (6), 484 (2006).
21. M. Esmann, N. U. Fedosova, and D. Marsh, *Biophys. J.* **94** (7), 2767 (2008).
22. J. Y. Lehtonen and P. K. Kinnunen, *Biophys. J.* **68** (2), 525 (1995).
23. C. J. Malajczuk, Z. E. Hughes, and R. L. Mancera, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (9), 2041 (2013).
24. B. M. García, C. O. Ferrusola, I. M. Aparicio, et al., *Theriogenology* **77** (7), 1280 (2012).
25. V. Ragoonanan, A. Hubel, and A. Aksan, *Cryobiology* **61** (3), 335 (2010).
26. N. Mohandas and J. A. Chasis, *Semin. Hematol.* **30** (3), 171 (1993).
27. A. Viallat and M. Abkarian, *Int. J. Lab. Hematol.* **36** (3), 237 (2014).
28. Y. C. Tanhehco and J. S. Berns, *Semin. Dial.* **25** (5), 539 (2012).
29. R. Sackowski, M. Maklin, T. Mesana, et al., *Artif. Organs* **36** (8), 668 (2012).
30. Н. М. Шпакова, Н. В. Орлова и Д. И. Александрова, *А.с. Украина № u 2010 00983, Б. И., № 17* (2010).
31. I. B. Bakaltcheva, C. O. Odeyale, and B. J. Spargo, *Biochim. Biophys. Acta* **1280** (1), 73 (1996).
32. G. Quan, L. Zhang, Y. Guo, et al., *CryoLetters* **28** (2), 95 (2007).
33. J. G. Dobbe, G. J. Streekstra, M. R. Hardeman, et al., *Cytometry* **50** (6), 313 (2002).
34. K. V. Patel, J. G. Mohanty, B. Kanapuru et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **765**, 211 (2013).
35. J. M. Higgins, *Clin. Lab. Med.* **35** (1), 43 (2015).
36. F. Wehner, H. Sauer, and R. K. H. Kinne. *J. Gen. Physiol.* **105**, 507 (1995).
37. M. Piagnerelli, K. Z. Boudjeltia, D. Brohee, et al., *J. Clin. Pathol.* **60** (5), 549 (2007).
38. S. N. Timasheff, *Methods Mol. Biol.* **40**, 253 (1995).
39. J. F. Carpenter and J. H. Crowe, *Cryobiology* **25** (3), 244 (1988).
40. K. B. Konov, N. P. Isaev, and S. A. Dzuba, *J. Phys. Chem. B* **118** (43), 12478 (2014).
41. Y. Liu, M. Shi, R. Cao, et al., *Chin. J. Chem. Eng.* **15** (5), 703 (2007).
42. E. Hidayanto, T. Tanabe, and J. Kawai, *Berkala Fisika (Edisi khusus)* **13** (2), A23 (2010).
43. J. B. Segur and H. E. Oberstar, *Ind. Eng. Chem.*, **43** (9), 2117 (1951).
44. A. N. De Belder, in *Amersham Biosciences*, AA Edition ([www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com), 2001) pp. 1–6.
45. T. Butler, C. A. Bradley, and J. E. Owensby, *Int. J. Exp. Pathol.* **73** (1), 27 (1992).
46. M. V. Kameneva, B. M. Repko, E. F. Krasik, et al., *ASAIO J.* **49** (5), 537 (2003).
47. И. Б. Заводник, Т. П. Пилецкая и И. И. Степура, *Укр. биохим. журн.* **63** (6), 72 (1991).
48. N. Mohandas and E. Evans, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 787 (1994).
49. S. Svetina, D. Kuzman, R. E. Waugh, et al, *Bioelectrochemistry* **62** (2), 107 (2004).
50. J. A. Chasis and N. Mohandas, *J. Cell. Biol.* **103** (2), 343 (1986).
51. Y. Tan, D. Sun, J. Wang, et al., *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **57** (7), 1816 (2010).
52. A. Enomoto, Y. Takakuwa, S. Manno, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1512** (2), 285 (2001).
53. W. H. Reinhart and S. Chien, *Blood* **67** (4), 1110 (1986).
54. W. H. Reinhart and S. Chien, *Am. J. Physiol.* **248** (5, Pt 1), 473 (1985).
55. S. Tuvia, S. Levin, and R. Korenstein, *FEBS Lett.* **304** (1), 32 (1992).
56. T. Mizuno, T. Tsukiya, Y. Taenaka, et al, *ASAIO J.* **48** (6), 668 (2002).
57. T. Betz, U. Bakowsky, M. R. Müller, et al., *Bioelectrochemistry* **70** (1), 122 (2007).
58. M. J. Headlam and R. C. Tuckey, *Arch. Biochem. Biophys.* **407** (1), 95 (2002).
59. L. A. Abriata, E. Spiga, and M. D. Peraro, *Biophys. J.* **111** (4), 743 (2016).

## **Effects of Cryoprotective Substances on Mechanical Stability and Geometrical Parameters of Human Erythrocytes**

**N.G. Zemlianskykh**

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine,  
Pereyaslavskaya ul. 23, Kharkov, 61016 Ukraine*

The aim of the study was to examine effects of sucrose, dextran, polyethylene glycol, glycerol and mannitol, having cryoprotective properties of various manifestation degrees, on the mechanical stability and the geometrical parameters of human erythrocytes. All substances, except mannitol, contributed to a decrease in hemolysis, caused by the movement of small beads. Glycerol and polyethylene glycol, providing the highest level of protection of erythrocytes during cryopreservation also showed the maximum efficiency under mechanical stress. Changes in cell resistance may be associated with the transformation of their geometrical parameters. According to the data from cytometry, 5% solutions of all the substances, except mannitol, caused similar changes in the cell geometric parameters. Implementation of the relationship between changes in the mechanical stability and the geometrical parameters of erythrocytes under the influence of cryoprotective agents may be due to modification of the membrane-cytoskeleton protein complex that controls mechano-elastic properties and morphology of erythrocytes.

*Keywords: erythrocyte, membrane, mechanical stress, cryoprotectants, cytometry*