



УДК 612.111.014.2:57.043

О. К. Гулевський, М. В. Рєпін, І. Й. Щенявський

## Порушення бар'єрних властивостей мембран еритроцитів при впливі низьких температур — результат дезорганізації надмолекулярної структури гемоглобіну

*(Представлено академіком НАН України А. М. Гольцевим)*

*Проведено порівняльне дослідження кріорезистентності нативних еритроцитів і реставрованих тіней еритроцитів. Встановлено, що реставровані тіні еритроцитів, в яких вміст гемоглобіну в 4–5 разів менший, ніж в еритроцитах, і він знаходиться у вигляді молекулярного розчину, мають значно більшу кріорезистентність порівняно з нативними еритроцитами, що особливо помітно при використанні низької концентрації кріопротектора — гліцерину (4%). Ці дані підтверджують раніше висунуту гіпотезу про значення надмолекулярної організації гемоглобіну в механізмі кріоушкодження еритроцитів.*

**Ключові слова:** кріорезистентність, кріоконсервування, еритроцити, кріопротектори, гемоглобін.

У даний час домінуючим уявленням про механізми кріоушкодження клітин є первинність порушення структурно-функціональних властивостей плазматичних мембран [1]. Відносно мембран еритроцитів це було показано в дослідженнях [2]: встановлено, що при повільному і швидкому (200–400 °С) заморожуванні відбувається порушення міжмолекулярної взаємодії поверхневих і інтегральних білків, білків цитоскелету. Є також численні докази кріоушкодження ліпідного бішару, включаючи його динаміку й асиметрію, що істотно для розуміння механізмів зміни бар'єрних властивостей мембран [1].

Не виключаючи значення первинних ушкоджень плазматичних мембран у механізмі кріоушкодження клітин, доцільним є з'ясування значення порушень фізико-хімічного стану їх цитоплазми, зокрема, відносно еритроцитів — порушення надмолекулярної організації гемоглобіну.

© О. К. Гулевський, М. В. Рєпін, І. Й. Щенявський, 2015

На наш погляд, зручною моделлю для з'ясування значення надмолекулярної організації гемоглобіну в механізмі кріоушкодження плазматичних мембран є реставровані тіні еритроцитів, в яких концентрація гемоглобіну в процесі їх отримання знижується в п'ять разів і він знаходиться у вигляді молекулярного розчину, тоді як плазматичні мембрани зберігають бар'єрні властивості практично в повному обсязі [3]. У зв'язку з вищевикладеним ми ставили за мету в порівняльному аспекті дослідити цілісність мембран нативних еритроцитів і реставрованих тіней еритроцитів після заморожування–відтавання за наявності низької концентрації (4%) кріопротектора.

**Матеріали і методи.** В роботі використовували еритроцити донорської крові людини з терміном зберігання 2–3 доби в консервувальному розчині “Глюгіцир”. Реставровані тіні еритроцитів отримували як описано в роботі [3]. Еритроцити тричі відмивали трис-сольовим розчином, що містить 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, рН 7,4, або фосфатно-сольовим буфером (ФСБ), що містить 150 мМ NaCl і 5 мМ Na<sup>+</sup>-фосфату, рН 7,4, шляхом центрифугування на холододу при 3000 г. Для отримання реставрованих тіней, частина відмитих еритроцитів піддається лізису шляхом додавання п'ятикратного об'єму холодного (2–4 °С) гіпотонічного розчину, що містить 4 мМ MgCl<sub>2</sub> і 10 мМ трис-HCl, рН 7,4, або в розчині, що містить 4 мМ MgCl<sub>2</sub> і 5 мМ Na<sup>+</sup>-фосфату, рН 7,4. Після 5 хв інкубації при 2–4 °С до гемолізату додавали 3 М NaCl або 3 М KCl до кінцевої концентрації 120 мМ і, витримавши 10 хв на холододу, для реставрації мембран інкубували 10 хв при 37 °С.

Реставровані тіні 3–4 рази відмивали шляхом центрифугування на холододу при 15 000 г протягом 3–5 хв холодним реставраційним середовищем, що містило, залежно від мети експерименту, 150 мМ NaCl чи KCl і 10 мМ трис-HCl, рН 7,4, 4, або ФСБ, рН 7,4 (для подальшого дослідження методом растрової електронної мікроскопії).

Відмиті зразки еритроцитів і реставрованих тіней еритроцитів піддавали заморожуванню з кріопротектором (4% гліцерин) або без нього. Розчин гліцерину готували на трис-сольовому буфері (150 мМ KCl чи NaCl і 10 мМ трис-HCl, рН 7,4) або на ФСБ, рН 7,4. Відмиті еритроцити або їх тіні змішували з розчином 4%-го гліцерину в співвідношенні 1 : 1, додаючи кріопротектор по краплях при помішуванні на холододу (2–4 °С). Після 15–20 хв інкубації при цій температурі досліджувані зразки об'ємом 2 мл поміщали в поліетиленові контейнери і заморожували в парах азоту (повільне заморожування до –196 °С зі швидкістю 1–2 °С за 1 хв) або шляхом занурення в рідкий азот (швидке заморожування до –196 °С зі швидкістю 200–400 °С за 1 хв). Видалення кріопротектора з системи після заморожування–відтавання не здійснювали. Еритроцити осаджували шляхом центрифугування при 3000 г протягом 1,5 хв, а тіні — центрифугуванням при 15000 г протягом 10 хв. Вихід гемоглобіну оцінювали у відсотках гемолізу за формулою Відсоток гемолізу =  $(E_1/E_2)100$ , де  $E_1$  — екстинкція надосаду зразка при  $\lambda = 545$  нм,  $E_2$  — екстинкція зразка при  $\lambda = 545$  нм після 100%-го гемолізу.

Вихід <sup>14</sup>C-сахарози з реставрованих тіней еритроцитів визначали після осадження білків супернатанту 5%-ю трихлороцтовою кислотою. Кислоторозчинну фракцію об'ємом 0,5 мл вносили в сцинтиляційну рідину і прораховували на сцинтиляційному лічильнику “Векман”. Вміст Na<sup>+</sup> і K<sup>+</sup> в еритроцитах і реставрованих тінях еритроцитів визначали методом полу-м'яної фотометрії [4]. За 100% прийнято сумарний вміст <sup>14</sup>C-сахарози в осаді і надосадовій рідині проби та вміст Na<sup>+</sup> у контролі. Контрольні зразки тіней, реставрованих у K<sup>+</sup>-вмісному середовищі, містили 112,2 ± 10,9 мМ Na<sup>+</sup> на 1 л тіней. <sup>14</sup>C-сахарозу вносили до гіпотонічного середовища в концентрації 1 мкКі/мл. Сумарна радіоактивність осаду і надосадової рідини реставрованих тіней становила 53104 ± 510 імп/хв. Після завершення реставрації ті-

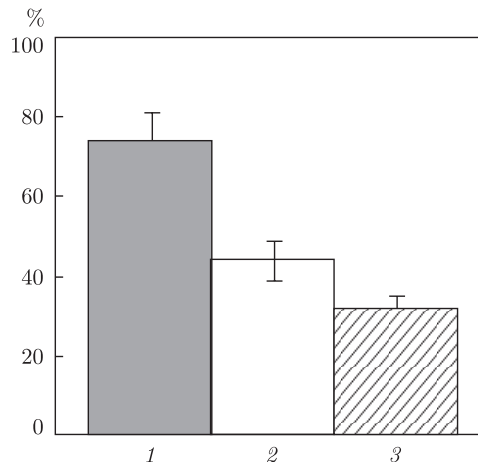


Рис. 1. Вміст гемоглобіну (1), <sup>14</sup>C-сахарози (2) і Na<sup>+</sup> (3) в реставрованих тінях еритроцитів після швидкого заморожування–відтавання без криопротектора.

За 100% прийнято внутрішньоклітинний вміст досліджуваних речовин до заморожування. Тіні еритроцитів реставрували в Na<sup>+</sup>-вмісному середовищі, після чого відмивали від позаклітинного натрію K<sup>+</sup>-вмісним трис-сольовим буфером

ней еритроцитів їх відмивали середовищем інкубації до досягнення фонового рівня радіації в надосадовій рідині.

Для дослідження еритроцитів і реставрованих тіней еритроцитів методом растрової електронної мікроскопії [6] суспензію еритроцитів або реставрованих тіней еритроцитів, попередньо оброблених як викладено вище, додатково відмивали від позаклітинного гемоглобіну шляхом одноразового центрифугування в розчинах ФСБ, що містять відповідні концентрації криопротектора. Потім відмиті зразки фіксували протягом 2 год в 1–2% розчині глутарового альдегіду, приготованого на ФСБ, що містить ті ж концентрації криопротектора, що і зразки. Після промивання у фосфатному буфері суспензію еритроцитів або реставрованих тіней еритроцитів збезводнювали по 10–15 хв у спиртах зростаючої концентрації (від 50 до 96%) і двічі — в абсолютному (98%) спирті. Зразки, поміщені на 10–15 хв в ацетонітрил, наносили тонким шаром на об'єктоутримувачі і відтінювали сріблом під кутом 45° у вакуумну напилювальну установку ВУП-5 М (АО “Selmi”). Перегляд зразків здійснювали в растровому електронному мікроскопі РЕММА-101 А (АО “Selmi”), в режимі вторинних електронів, при прискорювальній напрузі 20 кВ і збільшеннях від 1000 до 10 000 крат. Прилад забезпечений сертифікованою системою цифрового виводу зображення на монітор комп'ютера і програмою обробки зображення, розробленою НКФ “SEO Image Lab” (Суми, Україна).

**Результати досліджень.** Відомо, що при відсутності криопротекторів плазматичні мембрани нативних еритроцитів при швидкому, а тим більше при повільному заморожуванні–відтаванні практично повністю втрачають свої бар'єрні властивості [1]. Разом з тим, як встановлено нами, висока збереженість бар'єрних функцій мембран реставрованих тіней еритроцитів спостерігається навіть у випадку відсутності в середовищі заморожування криопротектора (рис. 1). Про це свідчать показники вмісту в них після заморожування–відтавання маркерних часток різного розміру: гемоглобіну, сахарози і Na<sup>+</sup> (м. м. 66800, 342 і 23 відповідно). Дійсно, вміст гемоглобіну в дослідних зразках становить близько 74% контролю. Дещо нижчий вміст у реставрованих тінях еритроцитів інших маркерних речовин:

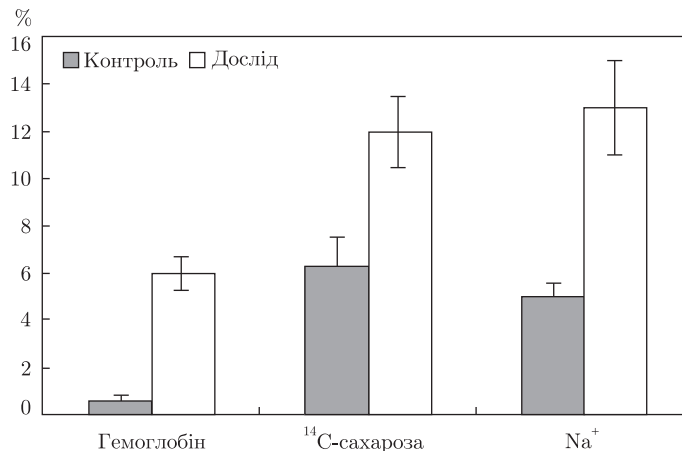


Рис. 2. Вихід гемоглобіну, <sup>14</sup>C-сахарози і Na<sup>+</sup> з реставрованих тіней еритроцитів протягом 1 год інкубації в умовах нормотермії після швидкого заморожування.

За 100% прийнято внутрішньоклітинний вміст досліджуваних речовин до інкубації в умовах нормотермії (+37 °C). Тіні еритроцитів реставрували в Na<sup>+</sup>-вмісному середовищі, після чого відмивали від позаклітинного натрію K<sup>+</sup>-вмісним трис-сольовим буфером

<sup>14</sup>C-сахарози (44%) і Na<sup>+</sup> (32%), що свідчить про формування в мембранах еритроцитів під час заморожування–відтавання трансмембранних пор різного розміру [3].

Високий рівень збереження бар'єрних функцій мембран реставрованих тіней еритроцитів після швидкого заморожування–відтавання підтверджується відносно незначним зниженням вмісту в них маркерних речовин після подальшої інкубації в умовах нормотермії. Після 60 хв інкубації при 37 °C показники виходу гемоглобіну, <sup>14</sup>C-сахарози і Na<sup>+</sup> з реставрованих тіней еритроцитів становлять 6, 12 і 13% відповідно (рис. 2).

Відмінності у виході маркерних речовин різних молекулярних мас ще раз підтверджують припущення про існування “незалікованих” пор.

Отримані дані свідчать про те, що видалення з еритроцитів значної частини гемоглобіну призводить до істотного підвищення кріорезистентності мембран реставрованих еритроцитів.

Пояснюючи отриманий факт, слід мати на увазі ту обставину, що при повільному заморожуванні за рахунок значного підвищення концентрації солей створюються умови, за яких внутрішньоклітинний гемоглобін може дисоціювати до димерів або навіть мономерів, внаслідок чого істотно змінюється осмотична сила внутрішньоклітинного вмісту еритроцитів і виникають передумови для їх набухання та розриву клітинних мембран. Ще більш вагомим у зміні осмотичних властивостей гемоглобіну є пошкодження його надмолекулярної структури під час швидкого або повільного заморожування внаслідок порушення надзвичайно вразливої до впливу фізико-хімічних факторів взаємодії між молекулами гемоглобіну, яка забезпечується особливим станом внутрішньоклітинної води — “структурованої води” [7], що зумовлює орієнтацію макромолекул [8–12]. Не виключено також, що одночасно з пошкодженням надмолекулярної структури цитозольного гемоглобіну порушується структура мембранозв'язаного гемоглобіну, який, будучи зв'язаним з інтегральним білком смуги 3, істотно впливає на структуру і бар'єрні функції мембрани [12].

Відомо, що самі по собі макромолекули білків, у тому числі з олігомерною організацією, зберігають свої структурно-функціональні властивості в процесі заморожування–

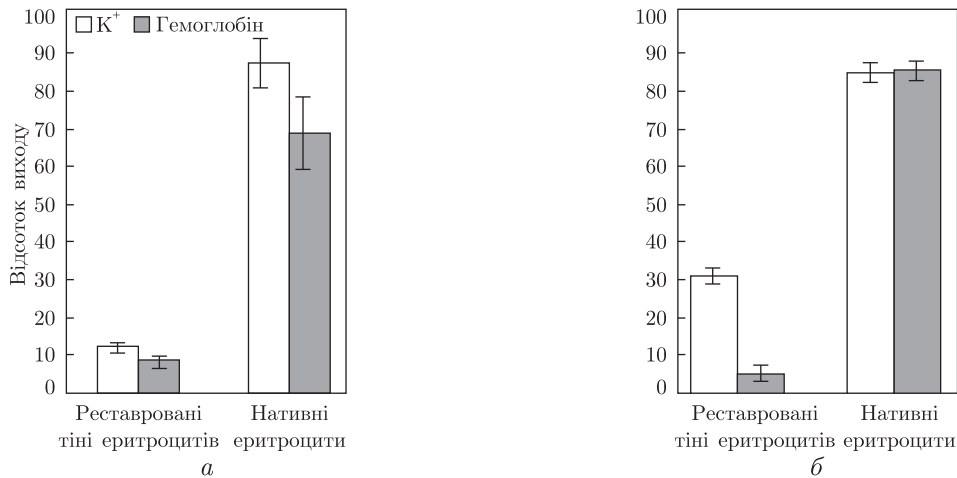


Рис. 3. Вихід  $K^+$  і гемоглобіну з еритроцитів і реставрованих тіней еритроцитів після швидкого (а) та повільного (б) заморожування–відтавання у середовищах з 4% гліцерину. Тині еритроцитів реставрували в  $K^+$ -вмісному середовищі, після чого відмивали від позаклітинного калію  $Na^+$ -вмісним трис-сольовим буфером

відтавання навіть при низьких концентраціях кріопротектора в середовищі [13–15]. Поряд з цим для збереження як самих еритроцитів, так і надмолекулярної структури гемоглобіну в них потрібна концентрація кріопротектора, зокрема гліцерину, не менше 30–40%, про що свідчать дані щодо кріоконсервування нативних еритроцитів.

Переконливими для визначення ролі надмолекулярної організації гемоглобіну є результати порівняльних експериментів по дослідженню кріочутливості нативних еритроцитів та реставрованих тіней еритроцитів при заморожуванні з низькими концентраціями гліцерину (4%). З рис. 3 видно, що, на відміну від нативних еритроцитів, реставровані тині еритроцитів, в яких гемоглобіну в 4–6 разів менше і він знаходиться у вигляді молекулярного розчину, значно краще зберігають бар'єрні функції плазматичних мембран. Тоді як з нативних еритроцитів при швидкому заморожуванні витікає 68,7% гемоглобіну та 87,3% внутрішньоклітинного  $K^+$ , реставровані тині втрачають лише 8,2 % гемоглобіну і 11,9%  $K^+$ . Дещо більший відсоток внутрішньоклітинного  $K^+$  (31,3%) втрачають реставровані тині еритроцитів при повільному заморожуванні, що найімовірніше пов'язано з дією на мембрани такого фізико-хімічного фактору, як гіперконцентрація солей, або з безпосереднім впливом цього фізико-хімічного чинника на цілісність макромолекул гемоглобіну, про що йшлося вище. В той же час за наявності 4% гліцерину нативні еритроцити втрачають близько 85% гемоглобіну і  $K^+$ , що свідчить про майже повну деструкцію їх плазматичних мембран.

Дані про більшу кріорезистентність мембран реставрованих тіней еритроцитів порівняно з нативними еритроцитами при заморожуванні за наявності низької концентрації кріопротектора підтверджуються результатами морфологічних досліджень. Аналіз морфологічної збереженості еритроцитів і реставрованих тіней еритроцитів при різних режимах заморожування за наявності 4%-го гліцерину за даними растрової електронної мікроскопії свідчить про їх істотні відмінності (рис. 4).

Для еритроцитів відзначається незалежно від режиму заморожування: фрагментація, утворення сфероцитів і тинеподібних деформованих структур з розмірами 2,8–5,2 мкм, тоді як до заморожування в розчині 4%-го гліцерину розмір еритроцитів становив у середньому 6,2 мкм. При обох режимах заморожування реставрованих тіней еритроцитів у середовищі,

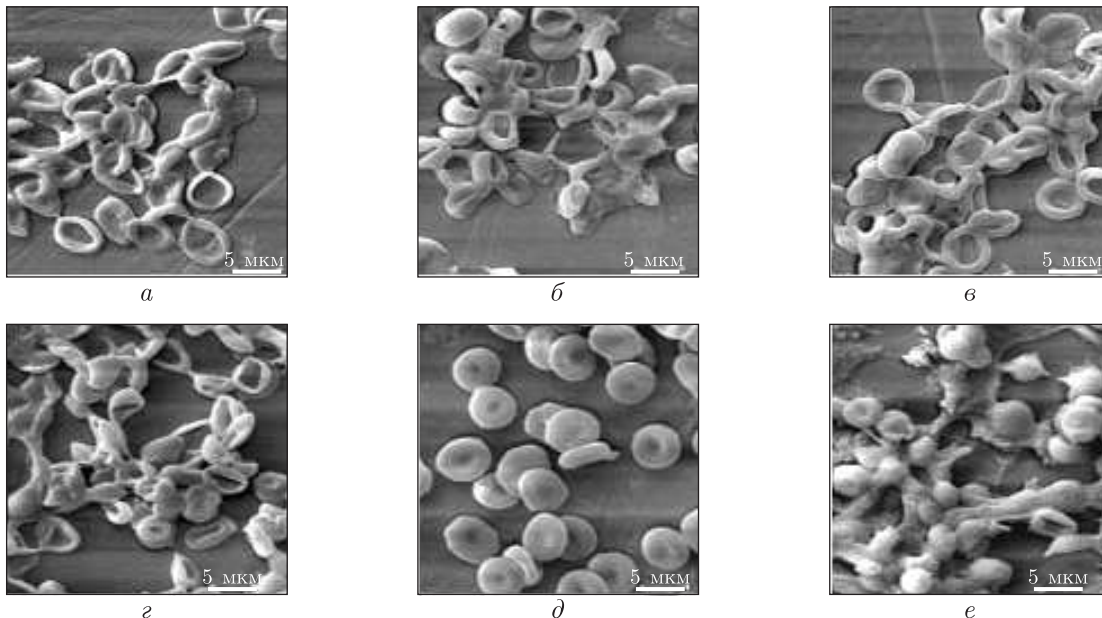


Рис. 4. Морфологічний стан реставрованих тіней (*a–г*) і еритроцитів (*д, е*) після впливу різних чинників: *a* — додавання 4% гліцерину; *б* — повільного заморожування; *в* — повільного заморожування за наявності 4% гліцерину; *г* — швидкого заморожування за наявності 4% гліцерину; *д* — додавання 4% гліцерину; *е* — повільного заморожування з 4%-м гліцерином

що містить 4% гліцерину, фрагментації і утворення сфероцитів не спостерігалось. Як і до заморожування, розмір реставрованих тіней еритроцитів коливався в межах 4,1–5,6 мкм, що свідчить про їх морфологічну збереженість.

Таким чином, результати дослідження свідчать про те, що значно більша криочутливість нативних еритроцитів пов'язана не стільки з прямою дією фізико-хімічних факторів низьких температур на структуру мембран, скільки з пошкодженням надмолекулярної організації гемоглобіну.

## Цитована література

1. Lovelock J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1953. – **10**. – P. 414–426.
2. Рязанцев В. В. Влияние физико-химических факторов замораживания на взаимодействие спектрина с мембранами липосом и эритроцитов: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. – Харьков, 1990. – 94 с.
3. Гулевский А. К. Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования: Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.22. – Харьков, 1986. – 374 с.
4. Steck T. L., Kant J. A. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes // *Methods Enzymol.* – 1974. – **31**. – P. 172–180.
5. Жуков А. Ф., Колосова И. Ф., Кузнецов В. В. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа: Учебник для вузов / Под ред. О. М. Петрухина. – Москва: Химия, 2001. – 496 с.
6. Репин Н. В., Юрченко Т. Н. Роль факторов среды и длительности экспозиции при 4 °С в сохранении формы эритроцитов и их мембраны. Механизм везикулообразования // *Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины* / Под ред. А. Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 165–206.
7. Тринчер К. С. Биология и информация (элементы биологической термодинамики). – Москва: Наука, 1965. – 121 с.
8. Щерба М. М. Физиология эритропоэза // *Физиология системы крови.* – Ленинград: Наука, 1968. – С. 52–93.

9. Ahlawat S., Chowdhury A., Kumar N., Uppal A., Verma R. S., Gupta P. K. Polarized Raman spectroscopic investigations on hemoglobin ordering in red blood cells // J. Biomed. Opt. – 2014. – **19**, No 8. – 087002.
10. *Water and the Cell* / Eds. G. H. Pollack, I. L. Cameron, D. N. Wheatley. – Berlin: Springer, 2006. – 354 p.
11. Джаксон М. Б. Молекулярная и клеточная биофизика. – Москва: Мир; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 551 с.
12. Хабатова В. В., Браже Н. А., Браже А. Р. и др. Исследование мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра // Сб. тез. V Междунар. конф. “Современные достижения бионанотехнологии”, Москва, 15–17 июня 2011 г. – Москва: Моск. гос. ун-т, 2011. – С. 60–61.
13. Розанова Е. Д. Влияние низких температур и криопротекторов на структуру и функцию изолированной цитохромоксидазы: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. – Харьков, 1984. – 143 с.
14. Соловьева А. С. Калориметрические исследования термоденатурации изолированных и мембранно-связанных белков в присутствии некоторых криопротекторов до и после охлаждения до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ : Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. – Харьков, 1998. – 131 с.
15. Говорова Ю. С., Зинченко А. В. Калориметрическое исследование термоденатурации гемоглобина в присутствии криопротекторов // Проблемы криобиологии. – 2012. – **22**, № 3. – С. 248.

## References

1. Lovelock J. E. Biochim. Biophys. Acta., 1953, **10**: 414–426.
2. Ryazantsev V. V. Influence of physical and chemical factors of freezing on spectrin interaction with liposome and erythrocyte membranes: Diss. of cand. of biol. sci., Kharkov, 1990 (in Russian).
3. Gulevskiy A. K. Barrier-transport properties of plasma membranes during cryopreservation: Diss. of doctor of biol. sci., Kharkov, 1986 (in Russian).
4. Steck T. L., Kant J. A. Methods Enzymol., 1974, **31**: 172–180.
5. Zhukov A. F., Kolosova I. F., Kuznetsov V. V. Analytical chemistry. Physical and physico-chemical methods of analysis, Moscow: Khimiya, 2001 (in Russian).
6. Repin N. V., Yurchenko T. N. Topical problems of cryobiology and cryomedicine, Kharkiv, 2012: 165–206 (in Russian).
7. Trinchler K. S. Biology and information (elements of biological thermodynamics), Moscow: Nauka, 1965 (in Russian).
8. Scherba M. M. Physiology of blood system, Leningrad: Nauka, 1968: 52–93 (in Russian).
9. Ahlawat S., Chowdhury A., Kumar N., Uppal A., Verma R. S., Gupta P. K. J. Biomed. Opt., 2014, **19**, No 8: 087002.
10. *Water and the Cell*. Eds. G. H. Pollack, I. L. Cameron, D. N. Wheatley, Berlin: Springer, 2006.
11. Dzhakson M. B. Molecular and cellular biophysics, Moscow: Mir; BINOM. Laboratoriya znaniy, 2009 (in Russian).
12. Khabatova B. B., Brazhe H. A., Braze A. P. et al. Abstracts of the V Intern. conf. “Recent Advances in Bionanoscopia”, Moscow, June 15–17, 2011: 60–61 (in Russian).
13. Rozanova Ye. D. Influence of low temperature and cryoprotectants on the structure and function of isolated cytochrome oxidase: Diss. of cand. of biol. sci., Kharkov, 1984 (in Russian).
14. Solovyova A. S. Calorimetric studies of thermal denaturation of isolated and membrane-bound proteins in the presence of certain cryoprotectant prior to and after cooling to  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ : Diss. of cand. of biol. sci., Kharkov, 1998 (in Russian).
15. Govorova Yu. S., Zinchenko A. V. Problemy kriobiologii, 2012, **22**, No 3: 248 (in Russian).

А. К. Гулевский, М. В. Репин, И. И. Щенявский

**Нарушение барьерных свойств мембран эритроцитов при  
воздействии низких температур — результат дезорганизации  
надмолекулярной структуры гемоглобина**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

*Проведено сравнительное исследование криорезистентности нативных эритроцитов и реставрационных теней эритроцитов. Установлено, что реставрированные тени эритроцитов, в которых содержание гемоглобина в 4–5 раз меньше, чем в эритроцитах, и он находится в виде молекулярного раствора, обладают значительно большей криорезистентностью по сравнению с нативными эритроцитами, что особенно заметно при использовании низкой концентрации криопротектора — глицерина (4%). Эти данные подтверждают ранее выдвинутую гипотезу о значении надмолекулярной организации гемоглобина в механизме криоповреждения эритроцитов.*

**Ключевые слова:** криорезистентность, криоконсервирование, эритроциты, криопротекторы, гемоглобин.

A. K. Gulevsky, M. V. Repin, I. I. Schenyavsky

**Low-temperature impairment of erythrocyte membrane barrier  
properties — a result of the disorganization of the supramolecular  
hemoglobin structure**

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

*Cryoresistances of native erythrocytes and resealed erythrocyte ghosts are compared. It is found that resealed erythrocyte ghosts, where the hemoglobin content is 4–5 times lower than that in erythrocytes, and it is in the form of a molecular solution, are much more cryoresistant than native erythrocytes, which is especially noticeable, when a low concentration of the cryoprotectant (4% glycerol) is used. These data confirm the earlier proposed hypothesis about the role of the supramolecular hemoglobin structure in the mechanism of cryoinjury of erythrocytes.*

**Keywords:** cryoresistances, cryoconservation, erythrocytes, cryoprotectants, hemoglobin.