

## Влияния криопротектора ПЭО-1500 и режимов обработки на асимметрию мембраны эритроцитов в процессе криоконсервирования

П.М. ЗУБОВ, Л.А. БАБИЙЧУК, В.В. РЯЗАНЦЕВ, О.Л. ТИМЧЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Мембрана эритроцитов структурно и функционально асимметрична. Существует выраженная асимметрия расположения фосфолипидов: фосфатидилхолин и сфингомиелин преимущественно локализованы во внешнем монослое, а фосфатидилэтаноламин (ФЭА) и фосфатидилсерин (ФС) располагаются во внутреннем [1]. Взаимодействия мембранного цитоскелета с фосфолипидным бислоем также вносят свой вклад в стабилизацию асимметричного распределения ФС в бислое. Полагают, что фосфолипиды ФЭА и ФС взаимодействуют со спектрином, основным белком цитоскелета и белками полосы 4.1 и 4.2. Нарушение структурной организации этих белков может привести к уменьшению взаимодействия между фосфолипидами и белками, увеличению скорости флип-флоп переходов и потере асимметрии липидного бислоя, что приводит к дестабилизации клеток [2]. В условиях криоконсервирования клетки подвергаются множественным генерализованным повреждениям и для минимизации этих эффектов используются криопротекторы. Введение непроникающего криопротектора ПЭО-1500 в клеточную суспензию может вызывать целый ряд адаптивных перестроек в клетках, позволяющих им выжить в процессе криоконсервирования.

Таким образом, целью данной работы было изучение влияния непроникающего криопротектора ПЭО-1500 и режимов обработки на асимметрию мембраны эритроцитов как на стадии эквilibрации с криопротектором, так и после размораживания суспензии клеток.

Объектом исследования служили эритроциты кордовой и донорской крови человека. Эритроциты подвергались трехкратной отмывке от плазмы и лейкоцитов в физиологическом растворе. Суспензия эритроцитов была разделена на 3 группы: контроль; эритроциты, к которым добавляли ПЭО-1500 при низкой положительной температуре (PEO-cold); эритроциты, к которым добавляли ПЭО-1500 при комнатной температуре (PEO-warm).

Исследования были проведены методом проточной цитофлуориметрии на проточном

цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США) с использованием реактивов фирмы Becton Dickinson. Для оценки числа эритроцитов с нарушенной асимметрией мембраны использовали набор Annexin V-FITC detection KIT I фирмы Becton Dickinson (США) в соответствии с Annexin V-FITC staining protocol. Сбор данных и анализ осуществляли с использованием программного обеспечения CELLQUEST (Becton Dickinson). Для минимизации ошибки в пробе собирали 500000 событий.

Аннексин V – 35-36 кДа  $Ca^{2+}$ -зависимый фосфолипидсвязывающий белок, который имеет высокое сродство к фосфатидилсерину и связывается с клетками, экспрессирующими на внешней стороне мембраны ФС. Анализ полученных результатов показал, что группа контрольных эритроцитов характеризовалась очень низким процентом аннексин  $V^+$ -клеток. Сравнение данного показателя у эритроцитов кордовой и донорской крови свидетельствует о более высоком проценте аннексин  $V^+$ -клеток кордовой крови по сравнению с эритроцитами донорской крови (таблица). Предобработка эритроцитов криопротектором ПЭО-1500 приводит к увеличению числа аннексин  $V^+$ -клеток, что может быть связано со структурными перестройками, вызванными действием криопротектора на клетку. Обращает на себя внимание тот факт, что обработка эритроцитов ПЭО-1500 при PEO-warm приводит к более выраженному связыванию аннексина V с ФС чем при PEO-cold. Это может свидетельствовать о большей степени нарушения асимметрии мембраны при PEO-warm и указывать на возможное повышение устойчивости эритроцитов на этапе замораживания в случае «холодовой» обработки клеток, где наблюдается минимальное нарушение асимметрии.

Определение аннексин  $V^+$ -клеток после размораживания показало, что процент клеток с экспонированным на внешней стороне мембраны ФС практически не отличается от соответствующих групп до криоконсервирования. Различия в проценте аннексин  $V^+$ -клеток в зависимости от способа обработки криопротектором также сохранялись. После деконсервации суспензии эритроцитов наблюдался невысокий уровень

*Адрес для корреспонденции:* Зубов П.М., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Процент аннексин V<sup>+</sup> клеток и гемолиз эритроцитов кордовой и донорской крови при разных режимах обработки и после размораживания

Источник эритроцитов	Показатель	Контроль	PEO – cold	PEO – warm	PEO – cold замораживание	PEO – warm замораживание
Кордовая кровь	Аннексин V <sup>+</sup>	0,06 – 0,1	0,1 – 0,16	0,2 – 0,4	0,1 – 0,2	0,2 – 0,4
	Гемолиз	Не наблюдается	Не наблюдается	Не наблюдается	1,6 – 1,8	2,3 – 3,5
Донорская кровь	Аннексин V <sup>+</sup>	0,02 – 0,03	0,05 – 0,09	0,08 – 0,2	0,04 – 0,09	0,06 – 0,09
	Гемолиз	Не наблюдается	Не наблюдается	Не наблюдается	2,1 – 2,5	2,2 – 3,8

гемолиза (таблица), особенно у эритроцитов, обработанных ПЭО при 0-4°C. Можно предположить, что в первую очередь гемолизируют аннексин V<sup>+</sup> клетки. Подтверждением этому может служить корреляция между уровнем аннексин V<sup>+</sup>-клеток до замораживания и уровнем гемолиза после оттаивания в зависимости от температурных режимов предобработки эритроцитов. Из таблицы четко видно, что процент аннексин V<sup>+</sup>-клеток и гемолиз эритроцитов с холодной предобработкой ниже, чем при обработке при комнатной температуре.

Холодовая обработка эритроцитов ПЭО-1500 в меньшей степени приводит к изменению локализации ФС в мембране эритроцитов, что коррелирует с более низким уровнем гемолиза после криоконсервирования по сравнению с эритроцитами, обработанными при комнатной температуре.

В процессе криоконсервирования с ПЭО-500 в первую очередь, по-видимому, гемолизу подвергаются эритроциты, меченные аннексином V до замораживания.

### Литература

1. Boas F., Forman L., Beutler E. Phosphatidilserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia // PNAS.– 1998.– Vol 95.– P. 3077-3081.
2. Jong K., Larkin S., Eber S. Hereditary spherocytosis and elliptocytosis erythrocytes show a normal transbilayer phospholipid distribution // Blood.– 1999.– Vol. 94, 1.– P. 319-325.2.