

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ С ГЛИЦЕРОЛОМ И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

© 2019 г. Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук

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

E-mail: nzemliansky@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2019 г.

После доработки 09.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Изучено образование активных форм кислорода в эритроцитах человека при инкубации в присутствии глицерол-маннитольной смеси и полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 Да, а также при гипотермическом хранении криоконсервированных под их защитой клеток. Анализ образования активных форм кислорода проведен методом проточной цитометрии по показателям флуоресценции дихлорфлуоресцеина. Установлено, что инкубация в глицерол-маннитольной смеси, а также криоконсервирование и последующее гипотермическое хранение не вызывали активации образования активных форм кислорода в эритроцитах. Действие полиэтиленгликоля приводило к интенсификации образования активных форм кислорода как при инкубации, так и при хранении криоконсервированных эритроцитов в условиях гипотермии. Особенности изменений интенсивности образования активных форм кислорода в эритроцитах под влиянием криопротекторных агентов и криоконсервирования могут оказывать значительное влияние на стабильность клеток в стрессовых условиях и их способность поддерживать функциональную полноценность при возвращении в физиологические условия.

Ключевые слова: активные формы кислорода, эритроцит, криоконсервирование, криопротектор, полиэтиленгликоль, глицерол.

DOI: 10.1134/S0006302919040082

Процессы замораживания-отогрева клеток сопровождаются целым спектром экстремальных физико-химических факторов [1], которые могут вызвать негативные изменения в структуре отдельных белков, белковых комплексов и мембранных систем. Сохранность и функциональная полноценность криоконсервированных эритроцитов человека определяется состоянием мембранно-цитоскелетного комплекса [2] и структурными изменениями основного цитозольного белка гемоглобина, содержащего металл с переменной валентностью в составе гемма [3]. Нарушения в структуре гемоглобина могут способствовать развитию окислительных процессов и дальнейшей химической модификацией данного белка и компонентов мембранно-цитоскелетного комплекса, вследствие чего возникают наруше-

ния барьерно-транспортных функций и механо-эластических свойств мембраны эритроцитов. В стрессовых условиях криоконсервирования возможно усиление процессов автокисления гемоглобина, сопровождаемых формированием активных форм кислорода (АФК) – супероксидного радикала $O_2^{\bullet-}$, перекиси водорода H_2O_2 и гидроксил-радикала $\bullet OH$, которые вступают в дальнейшие химические реакции окисления липидных и белковых компонентов мембранно-цитоскелетного комплекса. Даже в условиях, когда образование АФК незначительно превышает контрольные значения, клеточные компоненты могут реагировать на такие изменения, воспринимая их как регуляторный сигнал. В частности, на повышение образования АФК может отреагировать пероксиредоксин 2 [4], который содержит в структуре функциональную –SH-группу цистеина и участвует в защите клеток от окислительного стресса. Пероксиредоксин очень чувствителен к H_2O_2 и первым отвечает на изменения содержания АФК, поскольку его –SH-группы реагируют

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, КПА – криопротекторные агенты, ПЭГ – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 Да, DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин, DCFH-DA – 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетат, NOX – NADPH-оксидазы, CaM – кальмодулин.

с H_2O_2 на несколько порядков величины быстрее, чем $-SH$ -группы других белков [5]. Важно также отметить, что пероксиредоксин участвует в сигнальной трансдукции окисления белков [6] и может выполнять шаперонную функцию [7]. Все это может быть важным для модификации белков мембранно-цитоскелетного комплекса в условиях криоконсервирования. Возникает вопрос, могут ли криопротекторные агенты (КПА) инициировать окислительные процессы на этапе контакта с эритроцитами при положительной температуре и в какой мере процессы замораживания-отогрева, при которых в клетках происходят более существенные изменения, способны затрагивать образование АФК? Известно, что в процессе криоконсервирования часть клеток подвергается летальным или сублетальным повреждениям, в таких условиях возможность нарушений в структуре гемоглобина значительно увеличивается, что существенно повышает и вероятность развития окислительных процессов.

В медицинской практике для обеспечения стабильности эритроцитов человека в процессе замораживания-отогрева используется глицерол в качестве основного компонента криопротекторной среды [8]. Однако необходимость его удаления из клеток перед трансфузией делает процесс криоконсервирования длительным и трудоемким. Данный этап обусловлен проникновением глицерола в клетки, поэтому в процессе подготовки размороженных эритроцитов к возвращению в физиологические условия необходимо предотвратить развитие осмотического шока. Эффективный экзоцеллюлярный, т.е. не проникающий через мембрану, КПА мог бы позволить применять размороженные клетки без его удаления. Однако эритроциты, криоконсервированные под защитой различных экзоцеллюлярных веществ, оказываются нестабильными в физиологических условиях [8–10]. Для того чтобы понять причины нестабильности клеток, замороженных в присутствии экзоцеллюлярных КПА, необходим детальный анализ вызванных ими структурных и функциональных модификаций различных субклеточных систем, ответственных за поддержание целостности и функциональной полноценности эритроцитов, что может послужить своего рода инструментом целенаправленной корректировки или предотвращения негативных процессов. Возможность биохимической стабилизации клеток в процессе криоконсервирования была продемонстрирована на эритроцитах человека [11] и других типах клеток [12–14].

Одним из перспективных экзоцеллюлярных КПА может быть полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 Да (ПЭГ), который обеспечивает высокий уровень сохранности эритроцитов человека после размораживания [10], но при переносе криоконсервированных под его защитой

клеток в физиологические условия *in vitro* с течением времени отмечается постепенное увеличение гемолиза. Исследование пространственно-конформационных модификаций белков мембранно-цитоскелетного комплекса эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ, с использованием белок-сшивающего реагента диамида [15], показало изменение относительного содержания пероксиредоксина 2 (белка полосы 8 [16]) в белковом профиле теней при электрофорезе в полиакриламидном геле, что может свидетельствовать об окислительных процессах в клетке.

В связи с этим целью исследования было изучение действия криопротекторных смесей на основе глицерола и ПЭГ на образование АФК в эритроцитах человека на разных этапах процесса криоконсервирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие реактивы: 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетат (DCFH-DA), Трис, НЕРЕС, (Sigma, США), ПЭГ и $CaCl_2$ (Fluka, США), глицерол, маннитол, $NaCl$, KCl , $MgCl_2$ (квалификации «х.ч.» или «ос.ч.») и другие реактивы производства России и Украины.

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 осадку добавляли раствор 150 мМ $NaCl$, 10 мМ трис- HCl (рН 7.4) в объеме, пяти-семикратно превышающем объем клеточной массы, и отмывали от остатков плазмы и белых клеток трехкратным центрифугированием в аналогичном режиме.

К 500 мкл раствора Рингера с глюкозой при 37°C добавляли 50 мкл отмывтых эритроцитов (конечный гематокрит около 10% или 10^9 клеток/мл) и инкубировали в течение 15 мин. После этого из клеточной суспензии отбирали аликвоты по 10 мкл и соединяли с 250 мкл сред, содержащих криопротекторные среды (конечная концентрация $4 \cdot 10^7$ кл./мл), и инкубировали в течение 18 ч при 37°C. В работе использовали следующие среды: (1) – раствор Рингера с глюкозой (125 мМ $NaCl$, 5 мМ KCl , 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 32 мМ НЕРЕС (рН 7,4), 5 мМ глюкозы); (2) – раствор, содержащий 3,25 М глицерола, 0,22 М маннитола, 120 мМ $NaCl$, 10 мМ трис- HCl (рН 7,4); (3) – раствор, содержащий 0,2 М ПЭГ, 150 мМ $NaCl$, 10 мМ трис- HCl (рН 7,4).

По окончании инкубации к отобраным 50 мкл из каждой клеточной суспензии добавляли

раствор DCFH-DA (конечная концентрация $4 \cdot 10^{-5}$ М) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин в темноте. Затем добавляли 250 мкл соответствующих сред, снижая концентрацию клеток для измерений показателей флуоресценции 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF) (длина волны возбуждения/эмиссии 495 нм / 529 нм) методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur (Becton Dickenson, США).

Для оценки влияния криоконсервирования на образование АФК эритроциты, отмытые от плазмы и белых клеток крови, обрабатывали криозащитными средами, состав которых описан выше. Глицеролсодержащий раствор добавляли в равном объеме к эритроцитам, постоянно перемешивая, при комнатной температуре. ПЭГ-содержащий раствор добавляли к охлажденным эритроцитам в равном объеме при температуре около 5°C . Затем эритроциты переносили в контейнеры для замораживания и погружали в жидкий азот (-196°C). Отогрев проводили в водяной бане при температуре $42\text{--}44^\circ\text{C}$. После размораживания эритроциты отмывали от криопротекторов. Для глицеролсодержащих образцов процедура отмывки включала осаждение клеток центрифугированием (1200 г, 5–7 мин) и три этапа отмывки с использованием 600 мМ NaCl (первая отмывка) и 150 мМ NaCl (вторая и третья отмывка). Для образцов, криоконсервированных с ПЭГ, процедура отмывки включала осаждение клеток центрифугированием (800 г, 5–7 мин) с последующим разведением осажденных клеток равным объемом раствора, содержащего 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl (pH 7,4) с аналогичным режимом центрифугирования. Аликвоты криоконсервированных клеток (50 мкл), отобранные после размораживания, разводили в соответствующих средах, содержащих КПА (500 мкл), а клетки, отмытые от КПА, разводили аналогичным образом в растворе Рингера с глюкозой и хранили на протяжении 18 ч при 5°C . По окончании периода хранения концентрацию клеток снижали до $4 \cdot 10^7$ кл./мл путем разведения в соответствующих средах аналогично тому, как описано выше. Инкубирование эритроцитов с DCFH-DA и измерение показателей флуоресценции DCF методом проточной цитометрии выполнено в соответствии с вышеописанными процедурами.

Данные анализировали с помощью программы WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute, США). Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программного пакета Statgraphics plus 2.1 for Windows (Statistical Graphics Corp., США). Данные были протестированы на нормальность распределения с помощью теста Колмагорова–Смирнова и представлены в виде $M \pm SD$ (среднее значение \pm стандартное откло-

нение). Выборки являются зависимыми, эксперименты проведены на крови четырех разных доноров ($n = 4$). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименьшей значимой разницей. При $p < 0,05$ данные считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка интенсивности окислительных процессов в эритроцитах была выполнена с помощью $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, который дезэтерифицируется после прохождения через плазматическую мембрану, но остается нефлуоресцентным соединением (H_2DCF) до момента его взаимодействия с АФК, преимущественно с H_2O_2 , с образованием флуоресцирующей окисленной формы DCF. Для определения интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах человека использовали проточную цитометрию, позволяющую учитывать индивидуальные особенности отдельных эритроцитов, обусловленные, прежде всего, их возрастной гетерогенностью [17]. Изменения интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах под влиянием КПА и замораживания–отогрева характеризуются двумя параметрами — количеством клеток в зоне, соответствующей маркеру контрольных показателей, и значением медианы гистограммы распределения, показывающей величину, относительно которой клетки в выделенной зоне разделены на две равные по численности части. Медиана гистограммы позволяет объективно оценить сдвиг интенсивности окислительных процессов в клеточной суспензии после определенных воздействий на эритроциты, даже если количество клеток в зоне, соответствующей маркеру контрольных показателей, не меняется. Инкубирование эритроцитов в среде Рингера с глюкозой характеризует контрольные параметры интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах, относительно которых фиксируются изменения (рис. 1, кривая 1).

На первом этапе криоконсервирования клетки инкубируют с КПА, поэтому необходимо понимать, как сами криопротекторные среды влияют на баланс окислительно-восстановительных процессов в эритроцитах. Действие глицерол-маннитольной смеси не приводило к появлению клеток с более интенсивным свечением (рис. 1, кривая 2), чем в контроле, что подтверждалось данными количественного анализа гистограмм распределения клеток (табл. 1). Однако медиана гистограммы указывает на изменение интенсивности образования АФК в таких клетках, поскольку отмечается ее сдвиг в сторону меньших

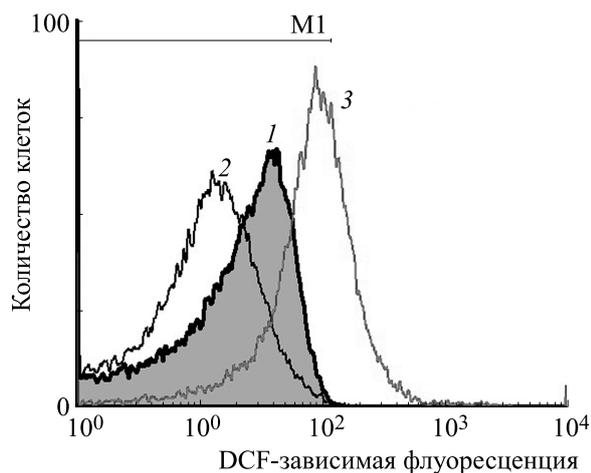


Рис. 1. Влияние КПА на интенсивность образования АФК в эритроцитах после инкубации в течение 18 ч при 37°C: 1 – контроль (гистограмма серого цвета), 2 – глицерол (3,25 М) + маннитол (0,22 М), 3 – ПЭГ (0,2 М).

значений. Такие изменения могут быть обусловлены замедлением интенсивности метаболических процессов и стабилизацией белков в присутствии глицерола, что снижает вероятность образования АФК в клетках. Кроме того, оба компонента криопротекторной смеси, глицерол и маннитол [18,19], обладают свойствами сквенджеров свободных радикалов, что также может объяснять снижение уровня АФК в эритроцитах в процессе инкубирования, поскольку данные вещества конкурируют с DCF при взаимодействии с H_2O_2 .

Инкубация эритроцитов в присутствии ПЭГ приводила к сдвигу гистограммы распределения клеток по показателям интенсивности флуоресценции DCF в сторону больших значений (рис. 1, кривая 3). Прежде всего, значительно уменьшается

количество клеток в зоне маркера контрольных показателей (табл. 1). Кроме того, значение медианы гистограмм более чем в два раза превосходит аналогичный показатель контрольных образцов (табл. 1). Такие изменения свидетельствуют об интенсификации окислительных процессов в эритроцитах в присутствии ПЭГ. Очевидно, что главное отличие ПЭГ от глицерола связано с экзоцеллюлярным механизмом его действия, что, прежде всего, предполагает потерю клетками воды, повышение внутриклеточной концентрации солей и перераспределение ионов. Изменения ионного состава внутриклеточной среды могут повлиять на структурное состояние белков и их конформационные переходы, связанные с осуществлением ферментативных процессов, что увеличивает риск образования АФК.

Оценка изменений интенсивности образования АФК в размороженных эритроцитах была выполнена после гипотермического хранения клеток. Гипотермическое хранение позволяет лучше понять отсроченные последствия криоконсервирования для функционирования различных субклеточных компонентов. Кроме того, при использовании криоконсервированных клеток нередко возникают ситуации, при которых трансфузия откладывается на определенный период, что предполагает необходимость их хранения в условиях гипотермии. При этом криопротекторы могут оставаться в среде в течение всего периода хранения или предварительно удаляются. Удаление эндоцеллюлярного криопротектора глицерола из суспензии криоконсервированных клеток – важный этап их подготовки к возвращению в физиологические условия [8]. Экзоцеллюлярный криопротектор можно не удалять из клеточной суспензии, поскольку он не проникает через мембрану, и его концентрация могла бы уменьшаться путем разведения в плазме в случае трансфузии. Однако перенос эритроцитов, крио-

Таблица 1. Количественная оценка гистограмм распределения эритроцитов по показателям интенсивности флуоресценции DCF при инкубации в растворах криопротекторов

Среды инкубирования	Количество клеток, %	Медиана, усл. ед.
Раствор Рингера с глюкозой (контроль)	99.8 ± 0.01	26.9 ± 3.1
Глицерол (3.25 М) + маннитол (0.22 М)	99.8 ± 0.01	$16.3 \pm 3.2^*$
ПЭГ (0.2 М)	$87.9 \pm 7.6^*$	$66.7 \pm 5.9^*$

Примечание. * Данные значительно отличаются от контрольных показателей с уровнем значимости $p < 0.05$.

консервированных под защитой экзоцеллюлярного криопротектора, в раствор Рингера с глюкозой после удаления защитного соединения позволяет оценить, насколько обратимыми являются модификации субклеточных компонентов, вызванных процессами замораживания-отогрева клеток. Поэтому эритроциты хранили как в присутствии КПА, так и в растворе Рингера с глюкозой после их удаления.

Этап размораживания клеток характеризует их наиболее существенные повреждения, поскольку в присутствии защитных сред многие сублетальные нарушения не обнаруживают себя и количество целых клеток на данном этапе может быть значительно выше, чем количество жизнеспособных. После гипотермического хранения размороженных эритроцитов в присутствии глицерола (рис. 2, кривая 2) образование АФК в клетках не отличалось от показателей контрольных клеток. Тем не менее гистограммы распределения размороженных клеток по интенсивности флуоресценции DCF все же значительно отличались от клеток, инкубированных в присутствии данного криопротектора без замораживания (табл. 1 и 2). Такой прирост значений медианы может указывать на возможность структурных нарушений в клетках, приводящих к некоторому увеличению образования АФК, компенсирующему предшествующее снижение данных показателей.

Гипотермическое хранение размороженных эритроцитов в присутствии ПЭГ характеризовалось существенной активизацией образования АФК (рис. 2, кривая 3). В данном случае на гисто-

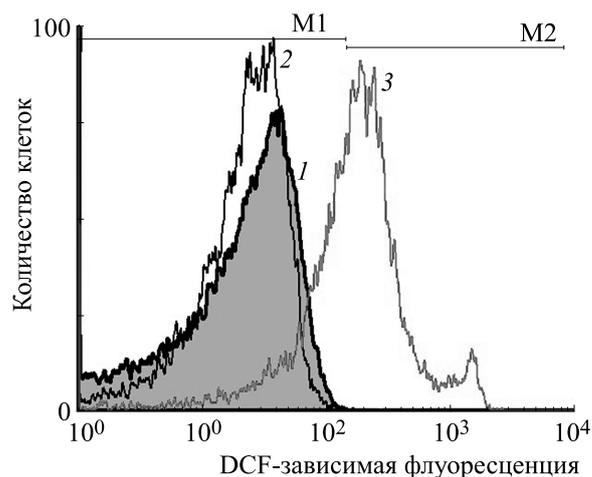


Рис. 2. Интенсивность образования АФК в криоконсервированных эритроцитах после хранения в течение 18 ч при 4°C в присутствии криопротекторных агентов: 1 – контроль (гистограмма серого цвета), 2 – глицерол (3,25 М) + маннитол (0,22 М), 3 – ПЭГ (0,2 М).

граммах можно выделить вторую зону М2, которая охватывает клетки с высокой интенсивностью образования АФК. Анализ гистограмм (табл. 2) показывает, что количество таких клеток может достигать 45%, а значение медианы зоны М2 по интенсивности флуоресценции DCF семивосьмикратно превышает контрольные значения. Кроме того, в зоне М1 интенсивность флуоресценции DCF превышает контрольные показате-

Таблица 2. Количественная оценка гистограмм распределения криоконсервированных эритроцитов по показателям интенсивности флуоресценции DCF в присутствии криопротекторов и после их удаления

Экспериментальные группы	Количество клеток, %		Медиана, усл. ед.	
	М1	М2	М1	М2
Раствор Рингера с глюкозой (контроль)	100	—	25.9 ± 3.1	—
Криоконсервированные эритроциты в присутствии криопротекторов				
Глицерол (3.25 М) + маннитол (0.22 М)	99.9 ± 0.01	—	27.5 ± 4.9	—
ПЭГ (0.2 М)	55.2 ± 19.1*	45.94 ± 18.9	36.6 ± 15.8*	191.0 ± 40.6
Криоконсервированные эритроциты после удаления криопротекторов				
Глицерол (3.25 М) + маннитол (0.22 М)	99.85 ± 0.01	—	9.6 ± 1.7*	—
ПЭГ (0.2 М)	64.2 ± 15.2*	37.0 ± 14.2	43.8 ± 7.0*	155.7 ± 24.3

Примечание. * Данные значительно отличаются от контрольных показателей с уровнем значимости $p < 0.05$.

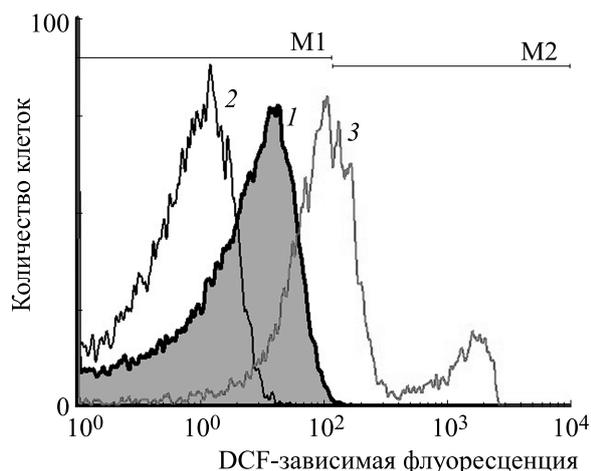


Рис. 3. Образование АФК в криоконсервированных эритроцитах в отсутствие КПА при хранении в течение 18 ч при 4°C: 1 – контроль (гистограмма серого цвета); 2 – глицерол (3,25 М) + маннитол (0,22 М); 3 – ПЭГ (0,2 М).

ли почти в два раза, о чем свидетельствует значение медианы (табл. 2). Интенсификация образования АФК в криоконсервированных под защитой ПЭГ клеток характеризует значительные сублетальные повреждения клеток. Сохранив целостность, такие клетки фиксируются датчиками проточного цитометра и вносят существенный вклад в показатели интенсивности образования АФК.

Гипотермическое хранение криоконсервированных эритроцитов после удаления глицерола и ПЭГ также выявляет существенные различия в образовании АФК в таких клетках. Как видно из данных, представленных на рис. 3 и в табл. 2, медиана гистограмм распределения интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах, криоконсервированных в присутствии глицерола, статистически ниже, чем в контрольной среде. Кроме того, в суспензии отсутствуют клетки, которые имели бы показатели флуоресценции, превышающие контрольные значения. Все это указывает на стабильность метаболических характеристик клеток, криоконсервированных в присутствии глицерола после удаления криопротектора и переноса в среду Рингера с глюкозой в условиях гипотермического хранения. Причины снижения интенсивности флуоресценции в первую очередь могут быть связаны с изменениями субпопуляционного состава суспензий эритроцитов после криоконсервирования и удаления КПА, что обусловлено лизисом части эритроцитов на каждом из этих этапов. Логично предположить, что лизису подвергаются субпопуляции старых эритроцитов, чувствительных к различным стрессам [17]. Поэтому преобладание в суспензиях зрелых и юных эритроцитов с высоким антиоксидантным потенциалом обуславливает снижение значений

медиан гистограмм распределения после удаления криопротекторов.

Анализ гистограмм распределения показателей флуоресценции DCF в эритроцитах, криоконсервированных в присутствии ПЭГ после удаления криопротектора и переноса в среду Рингера с глюкозой показал, что в условиях гипотермического хранения интенсивность окислительных процессов в целом не отличается от показателей при хранении эритроцитов в присутствии криопротектора (рис. 3, кривая 3; табл. 2). Даже потеря части клеток на этапе удаления КПА не останавливает развитие окислительных процессов, что указывает на достаточно серьезные нарушения в таких эритроцитах структурных и функциональных свойств субклеточных элементов, являющихся источниками образования АФК. По-видимому, неспособность криоконсервированных в присутствии ПЭГ эритроцитов поддерживать свою целостность после переноса в физиологические условия *in vitro* в значительной мере может быть связана с окислительными повреждениями субклеточных элементов.

Таким образом, использование глицерол-маннитольной смеси снижает образование АФК при положительной температуре и предотвращает развитие окислительных процессов в процессе криоконсервирования и последующего гипотермического хранения. В присутствии ПЭГ даже в процессе инкубации при положительной температуре отмечается активация образования АФК, а замораживание-отогрев и последующее хранение криоконсервированных клеток в условиях гипотермии еще усиливают развитие окислительных процессов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение окисленных форм гемоглобина, а именно метгемоглобина как маркера развития окислительных процессов в эритроцитах, показало, что его уровень не меняется при криоконсервировании и длительном хранении эритроцитов при -80°C в присутствии 40%-го глицерола [20]. Использование экзоцеллюлярных КПА трегалозы и декстрана для защиты эритроцитов при замораживании также не вызывало изменений уровня метгемоглобина [21]. Вместе с тем необходимо отметить, что метгемоглобин (HbFe(III)) может обратимо восстанавливаться до дезоксигемоглобина с помощью фермента NADH-цитохром *b5*-метHb-редуктазы [22], что влияет на общую оценку окислительных процессов в клетке. К тому же окислению подвергается не только гемоглобин, но и другие макромолекулы, вследствие чего могут существенно изменяться свойства мембраны [23,24]. Поэтому определение образующихся АФК является более чувстви-

тельным методом оценки развития окислительных процессов.

Известно, что основным источником АФК в эритроцитах является спонтанное автоокисление гемоглобина, в результате чего образуется метгемоглобин (HbFe(III)) и супероксидный радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), который имеет очень короткий период «жизни» и быстро превращается в H_2O_2 под влиянием супероксиддисмутазы [25]. Образовавшаяся H_2O_2 может участвовать в дальнейшем окислении гемоглобина. В результате таких реакций гемоглобин окисляется с образованием оксоферрил-гемоглобина (HbFe(IV)=O) и радикальной формы феррилгемоглобина ($\cdot\text{HbFe(IV)=O}$) [26]. Взаимодействие белковой и геммовой частей окисленного гемоглобина ослабевает [27,28], что приводит к диссоциации гемма и его дальнейшей деградации. В частности, возможно образование необратимых зеленых производных гемоглобина, включая холеглобин и сульфгемоглобин [29,30], которые имеют ковалентно модифицированное порфириновое кольцо и могут взаимодействовать с клеточными компонентами по гидрофобному механизму.

Вторым важным источником образования АФК в эритроцитах могут быть NADPH-оксидазы (NOX). В серповидных эритроцитах было показано, что значительная часть образования АФК опосредуется ферментативной активностью NOX [31]. В эритроцитах были идентифицированы четыре из пяти известных типов NOX (NOX1, 2, 4 и 5), которые существенно различаются по механизму сборки и регуляции их активности [32,33]. Следует отметить, что Ca^{2+} играет особую роль в регуляции NOX, поскольку он является ключевым активатором протеинкиназ C, фосфорилирующих составные компоненты NOX-комплексов, и прямым активатором наиболее простой структурной формы NOX5 [32,34].

Очевидно, что влияние КПА на образование АФК в эритроцитах в процессе криоконсервирования носит индивидуальный характер, т.е. определяется физико-химическими свойствами раствора исследованных химических соединений. Глицерол-маннитольная смесь не только не способствовала окислительным процессам, но даже снижала интенсивность образования АФК в эритроцитах при инкубации. Кроме того, замораживание—отогрев и последующее гипотермическое хранение продемонстрировали стабильность метаболических и структурных характеристик эритроцитов, с которыми связаны реакции образования АФК. Установленные факты согласуются с ранее отмеченными данными об отсутствии метгемоглобина в криоконсервированных под защитой глицерола эритроцитах [20]. Возможно, стабильность гемоглобина в процессе за-

мораживания—отогрева связана с присутствием КПА в непосредственном окружении белковых молекул.

В противоположность трегалозе и декстрану, которые в процессе криоконсервирования эритроцитов не выявили признаков стимулирования окислительных процессов [21], ПЭГ даже при положительной температуре способствовал интенсификации образования АФК, и данная тенденция усиливалась при гипотермическом хранении криоконсервированных эритроцитов. По своим физико-химическим свойствам ПЭГ существенно отличается от глицерола [35]. Основное отличие данных соединений связано с их способностью исключаться из гидратных слоев воды, окружающих макромолекулы и биомикроповерхности, на которых экспонированы различные химические группы, или преимущественно взаимодействовать с ними [35]. Благоприятные взаимодействия между сольвентами (глицерол и ПЭГ) и презентующими макромолекулы химическими группами означают, что сольвент предпочтительно связывается с ними, а не водой. В то же время при неблагоприятных взаимодействиях для сольвента, равно как и химических групп, энергетически более выгодно связываться с водой, а не между собой. Способность глицерола лишь слабо благоприятно взаимодействовать с атомами С ароматических соединений и атомами N амидных и катионных групп и неблагоприятно взаимодействовать с атомами O амидов и карбоксилатов, а также ионами солей делает его хорошим стабилизатором макромолекул. В то же время ПЭГ через внутренние группы полимерной цепи может сильно благоприятно взаимодействовать с атомом С алифатических соединений. Это позволяет предположить, что в стрессовых условиях осмотического сжатия клеток или в процессе замораживания—отогрева, когда молекулы мембраны изменяют свои структурные характеристики, ПЭГ может включаться в благоприятные взаимодействия с отдельными химическими группами макромолекул, изменяя их функциональные характеристики. В частности, это может касаться активности Ca^{2+} -АТФазы, единственной системы активного транспорта Ca^{2+} в эритроцитах человека. Ранее было установлено, что ПЭГ и глицерол по-разному влияют на активность Ca^{2+} -АТФазы [36–38]. В присутствии ПЭГ отмечалось резкое снижение ферментативной активности Ca^{2+} -насоса [36,37] и 10-кратное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в эритроцитах [39] даже в изотонической полиэтиленгликольсодержащей среде. В то же время инкубирование эритроцитов в гипертони-

ческом растворе глицерола сопровождалось медленным ростом интенсивности флуоресценции Fluo-4 на протяжении 30 мин, не превышая контрольные значения более чем на 30% [40]. Поэтому Ca^{2+} -зависимый механизм образования АФК, связанный с активацией NOX, может вносить существенный вклад в интенсификацию окислительных процессов в эритроцитах в присутствии ПЭГ. При этом усиление образования АФК может еще более инактивировать Ca^{2+} -АТФазу, поскольку повышение уровня АФК как во вне-, так и внутриклеточной среде сопровождалось окислением $-\text{SH}$ групп белков и уменьшением активности Ca^{2+} -АТФазы [41,42]. Инактивация ферментативной активности Ca^{2+} -насоса имела как обратимую, так и необратимую составляющую, что было связано с окислением $-\text{SH}$ -групп, недоступных для восстанавливающего действия глутатиона в клетке. Кроме того, окисление Ca^{2+} -АТФазы приводит к нарушениям ее регуляции кальмодулином (CaM) [43], что не позволяет клетке адекватно реагировать на сигналы, направленные на контроль уровня внутриклеточного Ca^{2+} . Увеличение образования АФК может также приводить к структурным изменениям самого кальмодулина, который опосредует Ca^{2+} -сигнал в регуляции структурного состояния и функциональной активности различных типов белков, включая Ca^{2+} -АТФазу. В частности, окисление метиониновых остатков CaM стабилизирует Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны в неактивной конформации, что может быть частью адаптивного ответа клетки [44] или сигналом к развитию эритроза. Кроме того, окисленный CaM влияет на активность протеинкиназ, в частности Ca^{2+} /CaM-зависимую протеинкиназу II [45], осуществляющую регуляторное фосфорилирование некоторых белков. Таким образом, интенсификация образования АФК в эритроцитах, наблюдаемая при криоконсервировании в присутствии ПЭГ, может иметь существенное влияние на Ca^{2+} - и CaM-зависимые процессы регуляции структурно-функционального состояния компонентов мембранно-цитоскелетного комплекса, ответственных на поддержание целостности клетки в условиях стресса.

Последствия окислительных процессов для эритроцитов связаны со снижением деформируемости мембран, повышением мембранной динамической жесткости и уменьшением механической стабильности [46]. Данные изменения структурно-функциональных свойств эритроци-

тов связаны в значительной степени с окислением белков мембранно-цитоскелетного комплекса, в частности белка полосы 3 [47]. Во фракции старых эритроцитов, характеризующихся повышенным содержанием MetHb, обнаружено взаимодействие последнего с белком полосы 3, которое, однако, происходит только в случае, если данный интегральный белок также подвергается перекисному окислению. Предполагают, что механизм комбинированного действия перекисного окисления белка полосы 3 и MetHb включает высокоаффинное кооперативное связывание MetHb с цитоплазматическим доменом окисленной формы белка полосы 3 благодаря его карбонилированию. Эта модификация приводит к диссоциации анкирина от белка полосы 3 и позволяет тетрамерному MetHb сшивать полученные димеры с образованием кластеров [47]. Кроме того, при значительных физических нагрузках, сопровождаемых окислительным стрессом, было установлено повышение фосфорилирования тирозина белка полосы 3, что приводило к изменению его структуры [48]. Фосфорилирование белка полосы 3 в таких условиях происходит благодаря окислению критических $-\text{SH}$ -групп мембранной фосфатазы, регулирующей баланс фосфорилирования-дефосфорилирования. Подобные изменения, связанные с окислением белка полосы 3, его взаимодействием с окисленными формами гемоглобина и диссоциацией анкирина, могут происходить в криоконсервированных под защитой ПЭГ эритроцитах, что определяет их нестабильность в физиологических условиях *in vitro*. Важно отметить, что антиоксидантный белок пероксиредоксин-2 также взаимодействует с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 [49]. Пероксиредоксин подвергается конформационному изменению после его связывания с белком полосы 3 без потери его пероксидазной активности. Было показано, что окисление белка полосы 3, индуцированное фенилгидразином, предотвращало ассоциацию пероксиредоксина с мембраной, что указывает на снижение возможностей для его функционирования в пределах клетки. В этом свете представляет интерес ранее обнаруженный факт изменения содержания пероксиредоксина 2 (белка полосы 8) в теньях криоконсервированных под защитой ПЭГ эритроцитов [16], что косвенно может свидетельствовать об окислении белка полосы 3 в таких условиях.

Таким образом, особенности изменения скорости образования АФК в эритроцитах под влиянием инкубирования и замораживания-отогрева в присутствии КПА могут оказывать значительный регуляторный эффект на состояние мем-

бранно-цитоскелетного комплекса и стабильность клеток в стрессовых условиях, а также способность поддерживать их функциональную полноценность в физиологических условиях *in vitro* после криоконсервирования. Особенности физико-химических свойств глицерола и ПЭГ, очевидно, определяют структурно-функциональные изменения клеточных компонентов, от которых зависит интенсивность образования АФК. Допуская, что такие изменения включают Ca^{2+} -зависимые механизмы активации образования АФК, можно попытаться использовать фармацевтические ингибиторы, блокирующие рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$, или дополнить криопротекторные среды определенными антиоксидантами, чтобы снизить негативные проявления нарушений субклеточных систем эритроцитов в процессе криоконсервирования в присутствии ПЭГ. Это может способствовать продвижению в разработке эффективных способов низкотемпературного хранения клеток под защитой экзоцеллюлярного КПА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- D. Gao and J. K. Critser, *ILAR J.* **41** (4), 187 (2000).
- N. Mohandas and E. Evans, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 787 (1994).
- S. Voskou, M. Aslan, P. Fanis, et al., *Redox Biol.* **6**, 226 (2015).
- S. G. Rhee, *Mol. Cells* **39** (1), 1 (2016).
- A. V. Peskin, N. Dickerhof, R. A. Poynton, et al., *J. Biol. Chem.* **288** (20), 14170 (2013).
- H. Sies, *J. Biol. Chem.* **289** (13), 8735 (2014).
- H. H. Jang, K. O. Lee, Y. H. Chi, et al., *Cell* **117** (5), 625 (2004).
- K. L. Scott, J. Lecak, and J. P. Acker, *Transfus. Med. Rev.* **19** (2), 127 (2005).
- K. Singbartl, R. Langer, and A. Henrich, *Cryobiology* **36** (2), 115 (1998).
- L. A. Babijchuk and N. G. Zemlianskykh, *Probl. Cryobiol.*, № 1, 35 (2001).
- C. T. Wagner, M. L. Martowicz, S. A. Livesey, et al., *Cryobiology* **45** (2), 153 (2002).
- E. Jiménez-Trigos, C. Naturil-Alfonso, J. S. Vicente, et al., *Reprod. Domest. Anim.* **48** (1), 15 (2013).
- R. Morató, D. Izquierdo, J. L. Albarracín, et al., *Mol. Reprod. Dev.* **75** (1), 191 (2008).
- M. N. Banday, F. A. Lone, F. Rasool, et al., *Cryobiology* **74**, 25 (2017).
- N. G. Zemlianskykh and L. A. Babijchuk, *Biologicheskie Membrany* **36** (2), 125 (2019).
- S. Sharma, V. Punjabi, S. M. Zingde, et al., *J. Membr. Biol.* **247** (11), 1181 (2014).
- K. Gwozdziński, A. Pieniazek, S. Tabaczar, et al., *Exp. Physiol.* **102** (2), 190 (2017).
- K. J. Davies and A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **262** (17), 8227 (1987).
- J. Bhattacharyya and A. G. Datta, *J. Physiol. Pharmacol.* **52** (1), 145 (2001).
- J. Lecak, K. Scott, C. Young, et al., *Transfusion* **44** (9), 1306 (2004).
- C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier, et al., *Cryobiology* **35** (2), 173 (1997).
- T. J. Moore, C. S. Walsh, and M. R. Cohen, *Arch. Intern. Med.* **164** (11), 1192 (2004).
- A. N. Hashmi and M. Saleemuddin., *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40** (3), 543 (1996).
- A. G. Kriebardis, M. H. Antonelou, K. E. Stamoulis, et al., *J. Cell. Mol. Med.* **11** (1), 148 (2007).
- H. P. Misra and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **247** (21), 6960 (1972).
- T. Kaniyas and J. P. Acker, *FEBS J.* **277** (2), 343 (2010).
- N. Shaklai, N. Avissar, E. Rabizadeh, et al., *Biochem. Int.* **13** (3), 467 (1986).
- J. W. Wyse and D. A. Butterfield, *Biochim. Biophys. Acta.* **979** (1), 121 (1989).
- C. C. Winterbourn, *Environ. Health Perspect.* **64**, 321 (1985).
- M. Sztiller, M. Puchala, A. Kowalczyk, et al., *Redox Rep.* **11** (6), 263 (2006).
- A. George, S. Pushkaran, D. G. Konstantinidis, et al., *Blood* **121** (11), 2099 (2013).
- S. H. Goh, M. Josleyn, Y. T. Lee, et al., *Physiol. Genomics* **30** (2), 172 (2007).
- A. Panday, M. K. Sahoo, D. Osorio, et al., *Cell Mol. Immunol.* **12** (1), 5 (2015).
- R. P. Brandes, N. Weissmann, and K. Schröder, *Free Radic. Biol. Med.* **76**, 208 (2014).
- D. B. Knowles, I. A. Shkel, N. M. Phan, et al., *Biochemistry* **54** (22), 3528 (2015).
- N. G. Zemlyanskikh and M. V. Khomenko, *Biologicheskie Membrany* **23** (6), 484 (2006).
- N. G. Zemlianskykh and L. A. Babijchuk, *Tsitologiya*, **58** (12), 964 (2016).
- N. G. Zemlyanskikh and O. A. Kofanova, *Biochemistry (Moscow)* **71** (8), 900 (2006).
- Y. V. Kucherenko and I. Bernhardt, *Ukr. Biokhim. Zh.* **78** (6), 46 (2006).
- O. A. Kofanova, N. G. Zemlyanskikh, L. Ivanova, et al., *Bioelectrochemistry* **73** (2), 151 (2008).
- R. P. Hebbel, O. Shalev, W. Foker, et al., *Biochim. Biophys. Acta.* **862** (1), 8 (1986).
- N. Pengpanichpakdee, T. Thadtapong, S. Auparakkitanon, et al., *Southeast. Asian J. Trop. Med. Public. Health.* **43** (5), 1252 (2012).
- K. D. Osborn, A. Zaidi, R. J. Urbauer, et al., *Biochemistry* **44** (33), 11074 (2005).
- B. Chen, M. U. Mayer, and T. C. Squier, *Biochemistry* **44** (12), 4737 (2005).
- A. J. Robison, D. G. Winder, R. J. Colbran, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356** (1), 97 (2007).
- F. A. Kuypers, M. D. Scott, M. A. Schott, et al., *J. Lab. Clin. Med.* **116** (4), 535 (1990).
- N. Arashiki, N. Kimata, S. Manno, et al., *Biochemistry* **52** (34), 5760 (2013).
- Y. Xiong, Y. Li, Y. Xiong, et al., *Cell Physiol. Biochem.* **32** (4), 1060 (2013).
- A. Matte, M. Bertoldi, N. Mohandas, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **55**, 27 (2013).

Production of Reactive Oxygen Species in Human Erythrocytes on Cryopreservation with Glycerol and Polyethylene Glycol

N.G. Zemlyanskikh and L.A. Babiychuk

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

The study is aimed to examine reactive oxygen species production in human erythrocytes during incubation of erythrocytes with a glycerol-mannitol mixture and polyethylene glycol with a molecular weight of 1500, as well as when red blood cells were frozen with a glycerol-mannitol mixture and polyethylene glycol and stored under hypothermic conditions. Analysis of reactive oxygen species production was performed by fluorescence-based flow cytometry using dichlorofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement. It has been established that incubation in the glycerol-mannitol mixture, as well as cryopreservation and subsequent hypothermic storage did not favor production of reactive oxygen species in erythrocytes. Polyethylene glycol caused a significant increase in the reactive oxygen species production both in terms of incubation and storage of cryopreserved erythrocytes under hypothermic conditions. Peculiarities of changes in the intensity of reactive oxygen species production in erythrocytes under the influence of cryoprotective agents and cryopreservation can have a significant impact on the stability of cells under stressful conditions and their capacity to maintain functional adequacy when returning to physiological conditions.

Keywords: reactive oxygen species, erythrocyte, cryopreservation, cryoprotectant, polyethylene glycol, glycerol