

ВЛИЯНИЕ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ, НА ПОВЕРХНОСТНЫЙ МАРКЕР CD44 ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков
E-mail: nzemliansky@gmail.com

Исследованы изменения поверхностного маркера CD44 в эритроцитах человека, экспонированных в криопротекторных средах, и оценено влияние окислительной модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса на его характеристики при изменении физико-химических параметров клеточного окружения. Глицерол, ДМСО, сахароза и ПЭГ-1500 при пролонгированном воздействии вызывают снижение уровня экспрессии CD44 и уменьшение количества CD44-позитивных клеток, что отражает достаточно тонкие перестройки в липидном бислое и системе белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов, которые могут влиять на устойчивость клеток в процессе криоконсервирования. Экзоцеллюлярные вещества (сахароза и ПЭГ-1500) оказывают более выраженное влияние на CD44 в эритроцитах по сравнению с исследованными веществами эндоцеллюлярного типа. Модификация белков мембрано-цитоскелетного комплекса окисляющим бифункциональным реагентом диамидом способствует усилению выявленных тенденций.

Ключевые слова: эритроцит, мембрана, CD44, белки мембрано-цитоскелетного комплекса, криопротекторы.

Введение. Поверхностный маркер CD44 представляет собой молекулу адгезии, опосредующую связь клеточных мембран с компонентами внеклеточного матрикса. Основным лигандом CD44 является гиалуроновая кислота [1]. CD44 также может взаимодействовать с ламелином, фибронектином, сульфатом гепарина и коллагенами I и IV типов [1–3]. В эритроцитах человека CD44 представлен стандартной изоформой (CD44s) [1], называемой также гемопозитической (CD44H). Молекулярная масса этого гликопротеида зависит от степени гликозилирования и составляет в среднем 80–95 кДа, из которых на пептидную часть молекулы приходится около 40 кДа [1, 3]. Аминокислоты экзоцеллюлярного домена могут быть гликозилированы посредством O- и N-гликозидных связей.

В структуре CD44 эритроцитов обнаружены антигены, относящиеся к двум различным системам групп крови – AnWj и In(a/b) [4]. В проксимальном участке экзоцеллюлярного домена CD44 находятся антигены AnWj, которые характеризуются высоким показателем распространенности [5]. Антигены In(a/b), идентифицированные в составе домена, связывающего гиалуроновую кислоту, располагаются в дистальном участке молекулы CD44. In(b) является широко распространенным антигеном, в то время как его антигенный In(a) в гомозиготной форме встречается крайне редко, что обуславливает возможность образования антител у его носителей при гемотрансфузии или беременности [2].

В норме эритроциты человека не проявляют адгезивной активности. Тем не менее адгезивные свойства эритроцитов, опосредованные различными молекулами, в том числе CD44, вовлечены в развитие патофизиологических процессов, связанных с вазоокклюзивными состояниями при серповидноклеточной анемии, наследственном сфероцитозе и других заболеваниях [6]. Несмотря на то, что роль CD44 в эритроцитах до конца не понятна, существуют доказательства его участия в межклеточной сигнализации, направленной на стимуляцию лимфоцитов и моноцитов [7, 8], и тем самым – на удаление из организма чужеродных объектов и апоптозных клеток. CD44 через цитоплазматический домен может участвовать в формировании связей с актиновыми компонентами цитоскелета [1]. В эритроцитах связь CD44 с цитоскелетом, очевидно, играет определенную роль в модуляции механоэластических свойств мембраны. Это косвенно подтверждается тем, что при наличии генетической модификации, приводящей к полной потере цитоскелетного белка полосы 4.2 и сопровождаемой повышением ассоциации

CD44 с цитоскелетом, наблюдается относительно мягкий фенотип анемии [9].

Изменения поверхностных маркеров, ассоциируемые со снижением жизнеспособности и стабильности клеток, отмечаются при старении *in vivo* и *in vitro* [10–13]. В стрессовых условиях, сопряженных с низкотемпературным хранением клеток, изменения поверхностных маркеров могут отражать структурно-функциональные перестройки мембран, влияющие на устойчивость клеток в экстремальных условиях. Известно, что в эритроцитах стабильность и механоэластические свойства мембраны в значительной мере зависят от белков цитоскелета, связанного точечными контактами с отдельными интегральными белками или белковыми комплексами, включающими молекулы адгезии CD44. В связи с этим исследования изменений поверхностных структур плазматических мембран, вызванных стрессовыми факторами, могут способствовать лучшему пониманию роли структурно-функциональных перестроек мембран в механизмах стабилизации клеток при экстремальных условиях. Неотъемлемым условием успешного криоконсервирования клеток является применение криопротекторных веществ. В условиях низких температур для защиты клеток используют эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы, которые проявляют свои свойства, проникая в клетки или оставаясь во внеклеточной среде. При криоконсервировании различных типов клеток в основном используют эндоцеллюлярные (проникающие в клетки) криопротекторы, в частности глицерол и диметилсульфоксид (ДМСО) [14–17]. Экзоцеллюлярные (непроникающие) криопротекторы, не имеющие широкого применения в настоящее время, тем не менее вызывают значительный интерес у исследователей [18–21], поскольку на их основе могут быть созданы безотмывочные технологии криоконсервирования. Среди не проникающих в клетки веществ дисахариды, в частности сахароза, и ряд полимерных соединений [20–22], в том числе полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500), могут рассматриваться в качестве перспективных экзоцеллюлярных криопротекторов.

Криопротекторы обоих типов вызывают в клетках структурно-функциональные измене-

ния, влияющие на их поведение в экстремальных условиях. Поскольку маркер CD44 является элементом регуляции свойств клеточной поверхности, а его взаимодействие с цитоскелетом оказывает влияние на стабильность эритроцитов при циркуляции в русле крови [9], можно предположить, что эти структурные элементы плазматической мембраны могут быть вовлечены в сложный комплекс индуцируемых криопротекторами изменений, от которых зависит устойчивость клеток в стрессовых условиях. Влияние белков мембрано-цитоскелетного комплекса на маркер CD44 при экспонировании эритроцитов в криопротекторных средах в общих чертах можно оценить, используя различные модификаторы белков. Модификация белков диамидом приводит к окислению тиоловых групп, способствуя формированию белковых агрегатов, ковалентно связанных дисульфидными мостиками [23]. Анализ распределения диамид-индуцированных дисульфидных мостиков среди различных белковых фракций теней эритроцитов показал, что CD44 действует преимущественно на спектриновые полипептиды [24, 25], в то время как другие белки мембрано-цитоскелетного комплекса подвержены его влиянию в меньшей степени. Таким образом, ограничивая динамику белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе, можно оценить их влияние на характеристики CD44 в эритроцитах при изменении физико-химических параметров клеточного окружения в присутствии криопротекторов.

Цель настоящей работы заключалась в оценке изменений характеристик поверхностного маркера CD44 в эритроцитах человека, экспонированных в средах эндо- и экзоцеллюлярных веществ, которые обладают криопротекторными свойствами, и определении влияния белков мембрано-цитоскелетного комплекса на характеристики CD44 эритроцитов при изменении физико-химических параметров среды с использованием окислительного реагента диамида.

Материалы и методы. В работе использовали следующие реактивы: CD44-FITC (BD Biosciences), бычий сывороточный альбумин (БСА) (PAA Laboratories GmbH, Австрия), Трис, HEPES, диамид, фенолметилсульфонилфлуорид

(PMSF), азид натрия, ЭДТА, додецилсульфат натрия (Ds-Na), β-меркаптоэтанол, краситель Coomassie Brilliant Blue G-250, акриламид, бис-акриламид («Sigma», США), бромфеноловый синий («Serva», Германия), глюкозу, ПЭГ-1500 («Fluka», США), а также глицерол, сахарозу, ДМСО, ТХУ, NaCl, KCl, MgCl₂ и CaCl₂ производства Украины и России (х.ч. или ч.д.а.).

Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, заготовленной с использованием глюкозо-цитратного раствора в Центре крови (г. Харьков). Эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга ОПН-3) при комнатной температуре, удаляли плазму и лейкоцитарные компоненты крови. Затем к осажденным эритроцитам добавляли раствор 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4 в объеме, пятишестикратно превышающем объем клеточной массы, и отмывали от остатков плазмы и белых клеток трехкратным центрифугированием в аналогичном режиме.

Лейкоциты выделяли из лейкоцитарной пленки, образующейся на поверхности осажденных эритроцитов при первом центрифугировании. В лейкоцитарной суспензии примесь эритроцитов лизировали и промывали раствором 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4.

Плотно упакованные эритроциты (50 мкл) суспендировали в 500 мкл растворов различных соединений, обладающих криопротекторными свойствами, с конечным гематокритом клеточных суспензий около 10 %. В экспериментах использовали следующие растворы: 2 М (18,5 %) и 3,26 М (30 %) глицерол; 2 М (15,6 %) ДМСО; 1 М (34,2 %) сахарозу; 0,133 М (20 %) и 0,2 М (30 %) ПЭГ-1500. Все растворы были дополнены 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4. Контрольные образцы нативных эритроцитов инкубировали в модифицированной Рингер-глюкозной среде: 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 32 мМ HEPES (рН 7,4), 5 мМ глюкоза, 0,5 % БСА.

Эритроциты инкубировали в присутствии исследуемых веществ в течение 20 ч при 37 °С. Затем клеточные суспензии разводили в соответствующих растворах до концентрации порядка 10⁷ клеток/мл. К отобраным 50 мкл разведенных клеточных суспензий добавляли 15 мкл препарата CD44-FITC и инкубировали

при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. После этого в клеточные суспензии добавляли 435 мкл соответствующих сред, снижая концентрацию эритроцитов до порядка 10⁶ клеток/мл, и оценивали связывание эритроцитами CD44-FITC методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur («Becton Dickenson», США). В каждом измерении просчитывали 30 000 событий. Данные анализировали с помощью программы WinMDI 2.8.

При исследовании влияния модификации белков мембрано-цитоскелетного комплекса на состояние маркера CD44 в эритроцитах, инкубируемых в различных растворах веществ, которые обладают криопротекторными свойствами, эритроциты предварительно обрабатывали диамидом. С этой целью отмытые от плазмы и лейкоцитарных компонентов эритроциты добавляли в Рингер-глюкозный раствор, содержащий 2,5 мМ диамида в соотношении 1:9 (конечный гематокрит 10 %), и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем аликвоты эритроцитарной суспензии соединяли с исследуемыми растворами до конечной концентрации порядка 10⁷ клеток/мл. Суспензии клеток инкубировали при 37 °С в течение 20 ч. После окончания периода инкубирования эритроцитов в растворах криопротекторных веществ проводили реакцию связывания маркера аналогично описанным процедурам.

На этапе завершения инкубирования эритроцитов с диамидом были отобраны аликвоты клеток для получения теней и последующей оценки модификации белков методом Ds-Na-ПААГ электрофореза. Выделение мембран эритроцитов осуществляли с помощью гипотонического шока по методу [26], лизируя клетки при 2 °С раствором следующего состава: 10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 0,1 мМ PMSF (соотношение объемов клеточной суспензии и лизирующего раствора составляло 1:30). Мембраны эритроцитов осаждали центрифугированием при 14 000 g в течение 10 мин (K-24 VEB MLW Zentrifugenban, Германия). Отмывку теней от гемоглобина повторяли трижды с использованием лизирующей среды, не содержащей PMSF. Затем к белым теням добавляли электрофорезный Sample буфер: 0,05 М Трис-НСl (рН 6,8), 2 % SDS, 20 %

глицерол, 0,7 мг/мл PMSF, 0,4 мг/мл NaN_3 , 0,01% бромфеноловый синий. Контрольные образцы, инкубированные без диамида, растворяли в Sample буфере аналогичного состава с включением 5%-ного β -меркаптоэтанола. Электрофорез проводили в камере Bio Rad Protein II Multi-Gel Casting chamber в плоских вертикальных Ds-Na-ПААГ по системе Лэммли [26]. В качестве разделяющего использовали градиентный гель с концентрацией полимеризуемых веществ 5–20 %. Белки в геле окрашивали Coomassie BB G-250 при комнатной температуре в течение 1 ч. Избыток красителя отмывали раствором 7%-ной уксусной кислоты. Для идентификации молекулярных масс белков использовали набор стандартных маркерных белков «Fermentas life sciences» RagaRuler SM0661.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного пакета Statgraphics plus 2.1 for Windows. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Количество экспериментов в каждой серии опытов было не менее пяти.

Результаты исследований. Проверка свойств используемого препарата CD44-FITC, предназначенного для взаимодействия с поверхностным маркером CD44, путем сравнения его способности связываться с лейкоцитами и эритроцитами человека подтвердила его высокую эффективность. Все лейкоциты связывали метку, а экспрессия маркера практически на порядок превышала уровень экспрессии CD44 в эритроцитах (рис. 1), что согласуется с ранее установленными фактами [27]. Основная часть лейкоцитов, меченных CD44, находилась в диапазоне от 10 до 1000 усл. ед. интенсивности флюоресценции (ИФ) FL1-канала со значением медианы гистограмм распределения, близким к 100 усл. ед. В суспензии эритроцитов только часть клеток связывала метку. В связи с этим было оценено распределение нативных эритроцитов, не инкубированных с CD44-FITC, в пределах FL1-канала с целью в дальнейшем исключить этот сегмент гистограммы из анализа (негативный контроль). Эритроциты, не меченные моноклональными антителами, распределялись в диапазоне 0–3,5 усл. ед. ИФ FL1 (рис. 1). Во всех дальнейших расчетах верхнее значение указанного диапазона слу-

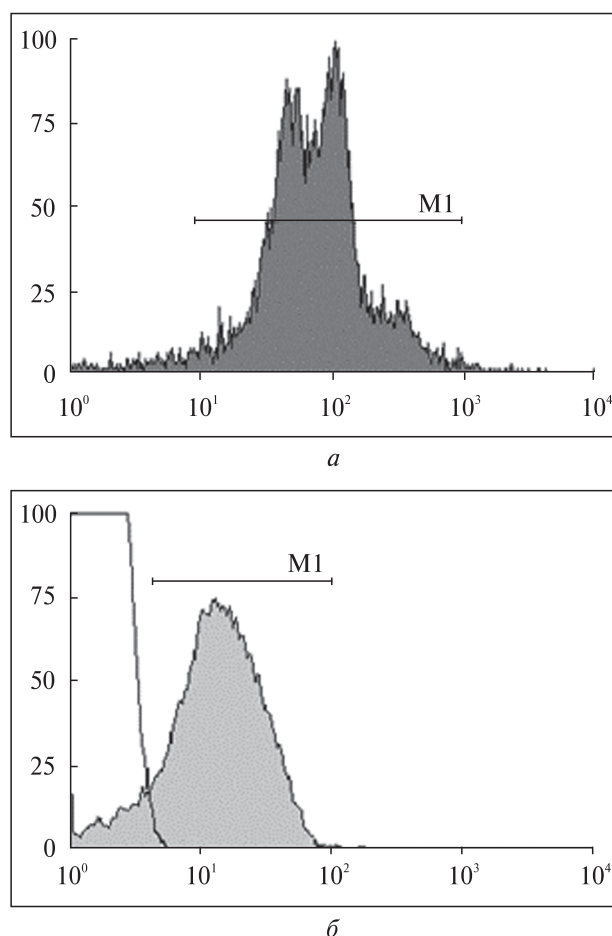


Рис. 1. Гистограмма распределения лейкоцитов (а) и эритроцитов (б), меченных CD44-FITC. Клетки экспонировались в среде Рингера. Гистограмма распределения нативных эритроцитов, не меченных CD44-FITC, показана контурной линией (негативный контроль). Представлены данные типичного эксперимента. Здесь и на рис. 2 по горизонтали – значения интенсивности флюоресценции клеток в FL-1 канале (усл. ед. ИФ FL1), шкала представлена логарифмическими значениями, по вертикали – количество просчитываемых событий

жило крайней границей маркеров гистограмм, отсекая долю CD44-негативных клеток. В нативной суспензии около 80 % эритроцитов были CD44-позитивными и распределялись в диапазоне от 3,5 до 100 усл. ед. ИФ FL1 (рис. 1) со средним значением медианы гистограмм распределения, представленным в таблице.

Метод проточной цитометрии позволяет анализировать различные характеристики клеточ-

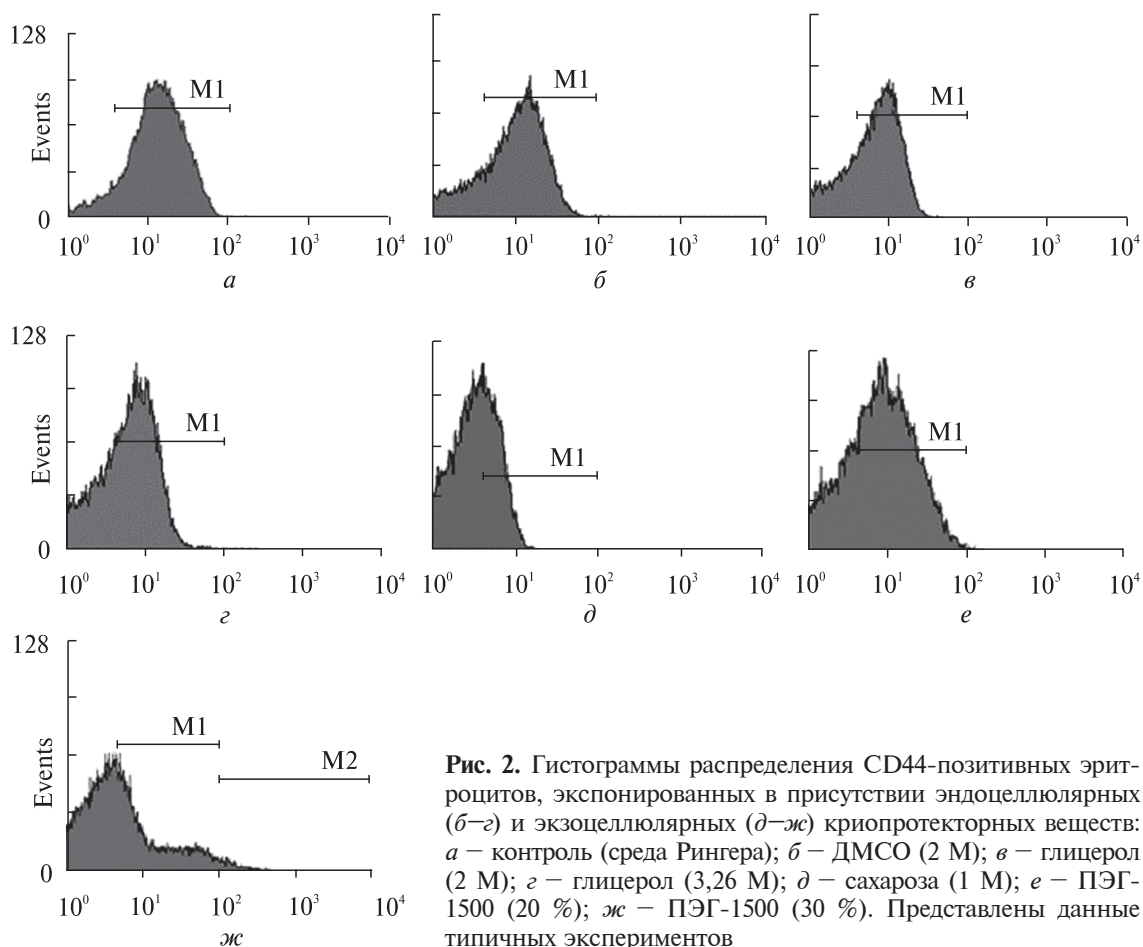


Рис. 2. Гистограммы распределения CD44-положительных эритроцитов, экспонированных в присутствии эндоцеллюлярных (б–г) и экзоцеллюлярных (д–ж) криопротекторных веществ: а – контроль (среда Рингера); б – ДМСО (2 М); в – глицерол (2 М); г – глицерол (3,26 М); д – сахароза (1 М); е – ПЭГ-1500 (20 %); ж – ПЭГ-1500 (30 %). Представлены данные типичных экспериментов

ных суспензий, в частности при экспонировании эритроцитов в растворах криопротекторов изменения состава клеточных суспензий могут быть охарактеризованы соотношением CD44-положительных и CD44-негативных эритроцитов. Важной характеристикой CD44-положительных клеток является уровень экспрессии поверхностного маркера CD44, т.е. количество или плотность молекул CD44 в мембранах клеток. Гистограмма распределения данного параметра отражает различный уровень интенсивности флуоресценции отдельных клеток. Изменение количества молекул CD44 в мембранах CD44-положительных клеток (экспрессии маркера) под влиянием определенных воздействий может приводить к изменению диапазона интенсивности флуоресценции, который охватывает зону CD44-положительных клеток. Медиана гистограммы распределения клеток, показывающая ве-

личину, относительно которой клетки в суспензии разделены на две равные по численности клетки части, адекватно характеризует изменение экспрессии маркера CD44 в клетках. При анализе изменений, связанных с характеристикой поверхностных маркеров, возможны различные варианты развития события. Например, при неизменном количестве CD44-положительных клеток экспрессия маркера может снижаться, или же уменьшение количества CD44-положительных клеток и снижение экспрессии могут происходить одновременно.

При инкубировании эритроцитов в течение 1 ч в растворах веществ, обладающих криопротекторными свойствами, не выявлено значимых отличий в гистограммах распределения CD44-положительных клеток относительно контрольных образцов (результаты не показаны). Для того чтобы понять, каким об-

разом упомянутые соединения могут влиять на мембранные белки, презентующие специфические маркеры на поверхности эритроцитов, временной диапазон экспонирования клеток в присутствии этих соединений был существенно увеличен. Увеличение времени экспозиции клеток в среде, содержащей криопротекторы, позволяет возможным незначительным по величине изменениям, обусловленным влиянием криопротектора на клетки, накапливаться до уровня, доступного для идентификации. Такой методический прием ранее использовали при исследовании изменений ряда структурно-функциональных характеристик мембран эритроцитов под влиянием как неспецифических, так и специфических факторов, в частности осмотического сжатия клеток в сахарозной среде и ингибиторов биохимических реакций [28–31].

При экспонировании клеток в течение 20 ч в растворах веществ, проникающих в клетки, наименьшее влияние на состояние CD44 в эритроцитах оказывал 2 М ДМСО (рис. 2, б и таблица). Экспонирование эритроцитов в растворе 2 М глицерола (рис. 2, в) приводило к снижению экспрессии CD44 на мембране, о чем

свидетельствует изменение значения медианы гистограмм распределения, и к уменьшению количества CD44-позитивных эритроцитов (таблица). Повышение концентрации глицерола в инкубационной среде до 3,26 М усиливало такие тенденции (таблица и рис. 2, г).

Экспонирование эритроцитов в средах, содержащих не проникающие в клетки вещества, сопровождалось более существенными изменениями характеристик мембранного маркера CD44. В сахарозной среде снижение количества CD44-позитивных клеток и уровня экспрессии поверхностного маркера было выражено максимально (рис. 2, д и таблица). Инкубирование эритроцитов в средах, содержащих ПЭГ-1500, характеризовалось более сложными изменениями (рис. 2, е, ж). Так, в суспензии эритроцитов, инкубированных в присутствии 20 % ПЭГ-1500, отмечалось уменьшение только числа CD44-позитивных клеток без значимого изменения уровня экспрессии маркера в зоне CD44-позитивных эритроцитов (таблица и рис. 2, е). В присутствии 30%-ного ПЭГ-1500 обнаружено снижение экспрессии CD44 в мембранах и уменьшение количества CD44-позитивных эритроцитов в диапазоне

Изменения параметров гистограмм распределения эритроцитов, меченных CD44-FITC, после экспонирования в присутствии различных веществ с криопротекторными свойствами

Растворы	CD44-позитивные клетки, %	Значение медианы гистограмм, усл. ед. ИФ FL1	Предварительное инкубирование с диамидом	
			CD44-позитивные клетки, %	Значение медианы гистограмм, усл. ед. ИФ FL1
Среда Рингера	79,3 ± 4,9	13,3 ± 1,3	75,9 ± 4,1	9,6 ± 0,5**
Глицерол, 2 М	67,5 ± 3,8*	9,6 ± 0,6*	63,1 ± 1,0***	8,0 ± 0,3***
Глицерол, 3,26 М	61,3 ± 9,0*	8,5 ± 1,1*	56,0 ± 3,0***	7,1 ± 0,1***
ДМСО, 2 М	73,1 ± 5,3	11,0 ± 1,1	67,0 ± 4,6***	8,7 ± 0,6***
Сахароза, 1 М	33,8 ± 5,3*	5,9 ± 0,3*	20,7 ± 5,1***	5,6 ± 0,2*
ПЭГ-1500, 20 %	68,6 ± 4,7*	11,6 ± 1,4	43,5 ± 6,3***	7,5 ± 1,5***
ПЭГ-1500, 30 %	41,9 ± 4,8*	9,1 ± 1,6*	22,5 ± 15,3***	5,7 ± 0,4***

Примечания. Для 30%-ного раствора ПЭГ-1500 представлены данные, соответствующие стандартному маркеру M1, и оценка достоверности различий между обработанными и не обработанными диамидом образцами проведена по данному диапазону. * Различия достоверны относительно контроля с уровнем значимости P < 0,05. ** Различия достоверны относительно соответствующих образцов, не обработанных диамидом, с уровнем значимости P < 0,05. Данные представлены в виде M ± SD.

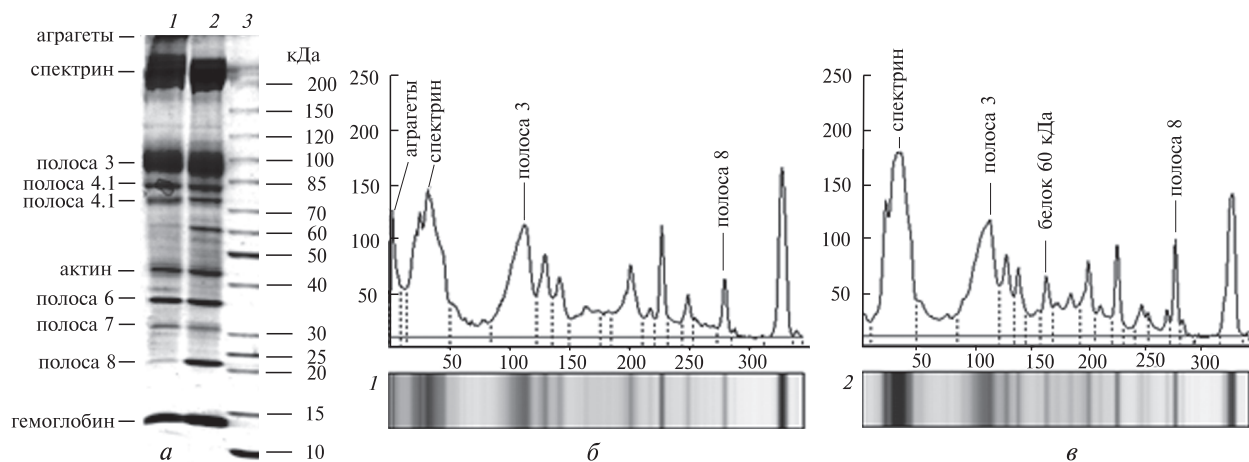


Рис. 3. Ds-Na-ПААГ электрофорез белков теней эритроцитов (*а*): 1 – эритроциты, обработанные диамидом; 2 – контрольные эритроциты, инкубированные в среде Рингера без диамида; 3 – маркерные белки; *б* и *в* – денситограммы белков теней эритроцитов: *б* – эритроциты, обработанные диамидом (дорожка 1); *в* – контрольные эритроциты (дорожка 2). Представлены данные типичного эксперимента

стандартных границ маркера М1 с одновременным появлением небольшого количества клеток ($2,3 \pm 1,0$ %) с экспрессией CD44 выше контрольных значений, соответствующих маркеру М2 на гистограммах (рис. 2, *ж*). Значение медианы для данного диапазона гистограмм составляло $157,3 \pm 15,1$ усл. ед. ИФ FL1.

Предварительная обработка клеток диамидом существенно влияла на состояние CD44 в эритроцитах, экспонированных в растворах криотекторов. Если в обработанных диамидом эритроцитах в среде Рингера отмечалось лишь небольшое снижение уровня экспрессии CD44 без изменения количества CD44-позитивных клеток (таблица), то в эритроцитах, экспонируемых в присутствии криопротекторных соединений, изменения были более значительными. Эндоцеллюлярные соединения ДМСО и глицерол в концентрации 2 М вызывали в обработанных диамидом эритроцитах снижение уровня экспрессии CD44 и количества CD44-позитивных клеток до практически равных значений. Увеличение концентрации глицерола в среде приводило к более существенному снижению количества CD44-позитивных клеток, хотя сдвиг значения медианы гистограмм распределения был не столь выраженным. Среди экзоцеллюлярных соединений лишь 20%-ный ПЭГ-1500 по своему влиянию на параметры CD44 в обработанных

диамидом эритроцитах мог сравниться с влиянием эндоцеллюлярных веществ, а 30%-ный ПЭГ-1500 и 1 М сахароза при экспонировании с эритроцитами, обработанными диамидом, вызывали резкое снижение как количества CD44-позитивных клеток, так и уровня экспрессии поверхностного маркера (таблица). Вместе с тем обработка клеток диамидом предотвращала развитие в мембране процессов, приводящих к образованию субпопуляции эритроцитов с высоким уровнем экспрессии CD44, соответствующей маркеру М2.

Данные Ds-Na-ПААГ электрофореза показывают, что интенсификация изменений характеристик CD44 в эритроцитах, обработанных диамидом, может быть связана с модификацией белков мембрано-цитоскелетного комплекса под влиянием реагента. Образование высокомолекулярных агрегатов на старте геля свидетельствует, о том, что часть белков вовлекается в процесс агрегации в результате окисления тиоловых групп (рис. 3, *а*, *б*). Тем не менее агрегация охватывает небольшую часть белков мембрано-цитоскелетного комплекса, сопровождаясь снижением их относительного содержания в общем спектре.

Результаты денситометрирования свидетельствуют о том, что агрегирование происходит главным образом за счет спектрина, белка с молекулярной массой 60 кДа и белка полосы 8,

а также небольшого количества белка полосы 3 (рис. 3).

Таким образом, вещества, обладающие криопротекторными свойствами, при пролонгированном воздействии вызывают снижение уровня экспрессии CD44 и уменьшение количества CD44-позитивных клеток в суспензии, что может отражать достаточно тонкие перестройки в липидном бислое и системе белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов, которые могут влиять на устойчивость клеток в процессе криоконсервирования. Экзоцеллюлярные вещества оказывают более выраженное влияние на CD44 в эритроцитах в сравнении с исследованными веществами эндоцеллюлярного типа. Модификация белков мембрано-цитоскелетного комплекса окисляющим бифункциональным реагентом диамидом способствует усилению упомянутых тенденций.

Обсуждение полученных данных. В присутствии веществ, обладающих криопротекторными свойствами, существенно меняются физико-химические параметры клеточного окружения, что отражается на свойствах внутриклеточной среды. В результате этого могут изменяться функциональные характеристики активности различных ферментов [32, 33] и систем мембранного транспорта [34]. В присутствии криопротекторов также могут происходить структурные перестройки мембранных липидов [35, 36] и белков цитоскелета [37]. Вместе с тем при кратковременном экспонировании эритроцитов в присутствии исследованных веществ не выявлено значимых отличий в гистограммах распределения CD44 относительно контрольных образцов. Очевидно это связано с тем, что криопротекторы 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 эндоцеллюлярные и экзоцеллюлярные вещества способны индуцировать в эритроцитах структурно-функциональные изменения, которые при пролонгированной экспозиции эритроцитов в криопротекторных средах приводят к снижению уровня экспрессии CD44 и количества CD44-позитивных кле-

ток. С увеличением концентрации как эндоцеллюлярного, так и экзоцеллюлярного веществ обнаруженные тенденции в целом усиливаются, хотя при повышении концентрации ПЭГ-1500 демонстрирует специфическую черту, связанную с появлением небольшого количества клеток с высокой экспрессией маркера CD44 (M2). Появление в присутствии 30%-ного ПЭГ-1500 этой субпопуляции эритроцитов в условиях отсутствия синтеза белка в клетках вероятно связано со структурными изменениями в мембранах, при которых может происходить слияние различных мембранных систем, что приводит к обогащению клеток маркером CD44. Известно, что полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами способствуют агрегации и слиянию клеток [41, 42]. Тем не менее ПЭГ-1500, как было ранее показано [43], не вызывает слияния эритроцитов. Для этого используют ПЭГ-6000 в концентрации около 40 %, к тому же слияние клеток требует дополнительных условий, одним из которых является клеточная регидратация [44]. В данном случае осмолярность среды не менялась на протяжении всего эксперимента. Очевидно в мембранах эритроцитов при контакте с высокими концентрациями ПЭГ-1500 все же могут инициироваться структурные перестройки, которые со временем приводят к формированию достаточных по площади участков с измененной структурой, что обеспечивает слияние мембранных систем. Можно предположить, в частности, что в данных экспериментальных условиях происходит слияние части эритроцитов с везикулами, образующимися при фрагментации мембран в условиях стресса.

Потеря части мембранного материала в форме везикул представляется наиболее вероятной причиной снижения экспрессии CD44 на поверхности эритроцитов, наблюдаемой в присутствии криопротекторных веществ. Среди факторов, способствующих везикуляции, важную роль может играть трансформация клеток, проявляющаяся в формировании локальных выпячиваний [45]. Известно, что везикуляция мембран эритроцитов может происходить как в стрессовых [46, 47], так и физиологических условиях, в частности, в процессе старения *in vivo* [48]. Таким образом клетки могут избавляться от участков мембраны, которые несут

в себе специфические маркеры старения, распознаваемые иммунокомпетентными клетками, и безопасно оставаться долгое время в русле крови [48]. Параллельно со снижением экспрессии CD44 экспонирование эритроцитов в присутствии криопротекторных веществ вызывает увеличение количества CD44-негативных клеток. Это обусловлено неоднородностью распределения маркера на поверхности отдельных клеток, в результате чего потеря CD44 эритроцитами с низким исходным уровнем экспрессии приводит к формированию CD44-негативных клеток. В связи с тем, что в эритроцитарной суспензии присутствуют клетки разных возрастов, увеличение количества CD44-негативных клеток может быть объяснено их возрастной гетерогенностью, поскольку старые эритроциты характеризуются меньшей устойчивостью к различным стрессовым воздействиям [49, 50]. Кроме того, известно, что в процессе старения эритроциты теряют сиаловые кислоты [51], важный компонент гликокаликса, частью которого являются олигосахаридные структуры молекулы CD44. Это позволяет предположить, что обнаруженные изменения характеристик CD44 в эритроцитах в присутствии криопротекторных соединений в первую очередь должны затрагивать популяции более зрелых и старых клеток.

Анализируя различия между параметрами CD44 эритроцитов в растворах разных эндо- и экзоцеллюлярных соединений можно отметить, что степень модификации клеток прямо коррелирует с массовой долей криопротекторов в растворе. Минимальные изменения маркера CD44 происходят в эритроцитах, экспонированных в 2 М ДМСО, где массовая доля криопротектора наименьшая (15,6 %), а максимальные — в сахарозной среде, где массовая доля криопротектора наибольшая (34,2 %). По-видимому активность воды и химический потенциал криопротекторных компонентов растворов являются наиболее значимыми характеристиками физико-химических свойств среды, от которых зависит степень модификации структурно-функциональных характеристик мембран эритроцитов.

Механизмы, лежащие в основе изменения параметров поверхностного маркера CD44 в

присутствии криопротекторных соединений, могут быть связаны с влиянием физико-химических свойств растворов на межмолекулярные взаимодействия в мембране [35, 36, 52, 53]. Изменения параметров CD44 могут зависеть от структурных модификаций липидного бислоя и/или изменений в системе белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе. Показано, например, что индуцированная молекулами ПЭГ сегрегация липидов разного типа в системе мультимерных везикул связана с их дегидратацией. В присутствии ПЭГ отмечалось снижение эффективного размера полярных головок фосфолипидов, формирующих мембраны и усиление ванн-дер-ваальсовых взаимодействий между ацильными цепями липидного матрикса [35]. Результатом таких структурных изменений была сепарация липидов разных типов, сопровождаемая появлением отдельных нестабильных участков мембраны на границах формирующихся липидных фаз. Модификация структуры липидного бислоя, обусловленная присутствием криопротекторных веществ, может способствовать процессам везикуляции с захватом интегральных белков, не связанных с цитоскелетом, и снижению их экспрессии на поверхности мембраны.

Способствовать потере поверхностного маркера могут также изменения связей между мембранными белками и цитоскелетом эритроцитов под влиянием криопротекторов. Известно, что молекулы CD44 связаны с белками цитоскелетной сети. Такие связи являются динамическими и могут различаться в разных участках мембраны [1, 3]. В эритроцитах человека выявлена способность CD44 взаимодействовать с цитоскелетом через анкирин и белок полосы 4.1 [54]. Кроме того, CD44 вместе с другим поверхностным маркером CD47 включается в формирование макрокомплексов с участием белка полосы 4.1 [55]. Изменение динамики белковых взаимодействий в данном комплексе может влиять на экспрессию поверхностного маркера CD44. Так, в эритроцитах пациентов с генетически обусловленным дефицитом белка полосы 4.1 отмечалось снижение экспрессии CD44 [55]. Если допустить, что в присутствии криопротекторов происходит

ослабление взаимодействий в системе данного макрокомплекса белков, то потеря CD44 будет усиливаться. Важно отметить, что изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} могут играть ключевую роль в инициации данных процессов, поскольку Ca^{2+} и кальмодулин снижают сродство взаимодействия белка полосы 4.1 с CD44 [54]. Различия, обнаруженные в изменениях уровня внутриклеточного Ca^{2+} [56, 57] и активности Ca^{2+} -АТФазы [58, 59] при экспонировании эритроцитов с эндо- и экзоцеллюлярными криопротекторами, могут объяснить более интенсивные изменения параметров CD44 в присутствии экзоцеллюлярных веществ.

Влияние криопротекторов на поверхностный маркер CD44 может быть опосредовано также перераспределением связей между CD44, анкирином и основным интегральным белком мембран эритроцитов (белком полосы 3). Такое предположение опирается на результаты, которые получены при исследовании эритроцитов больных наследственным сфероцитозом, связанным с дефицитом белка полосы 4.2 [9]. Установлено, что в таких эритроцитах при ослаблении связей между анкирином и белком полосы 3 повышается ассоциация CD44 с цитоскелетом. Можно допустить, что под влиянием криопротекторов усиление взаимодействия между анкирином и белком полосы 3 может повлиять на связи CD44 с цитоскелетом и способствовать захвату поверхностного маркера в формирующиеся везикулы.

Предполагаемое перераспределение взаимодействий в сети белков мембрано-цитоскелетного комплекса с участием CD44, анкирина и белков полос 4.1 и 3 в присутствии криопротекторов может отразиться на физических свойствах мембраны, способствуя изменению устойчивости эритроцитов в стрессовых условиях криоконсервирования. Ранее было показано, что модуляция взаимодействий интегрального белка полосы 3 с анкирином имеет отношение к регуляции механоэластических свойств мембраны эритроцитов [60]. В частности продемонстрировано, что усиление взаимодействий белка полосы 3 с анкирином, сопровождаемое диссоциацией белка полосы 4.1, приводит к снижению деформируемости эритроцитов, но значительно повышает их механическую стабильность. Подобные изме-

нения механоэластических свойств мембраны под влиянием криопротекторов могут играть важную роль в выживаемости клеток при криоконсервировании. Возможно, связанные с маркером CD44 изменения отражают такого рода перестройки в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов при действии криопротекторов. Необходимо подчеркнуть, что изменения параметров маркера CD44 под влиянием криопротекторов проявляются только после продолжительной экспозиции эритроцитов, что указывает на достаточно тонкий характер предполагаемых изменений на начальном этапе.

Доказательством влияния белков мембрано-цитоскелетного комплекса на поверхностный маркер CD44 в условиях изменения физико-химических параметров клеточного окружения в присутствии криопротекторных веществ могут служить эксперименты по модификации белков диамидом. Последствия такой модификации белков для CD44 эритроцитов, экспонированных в криопротекторных средах, невозможно заранее определить. В экспериментах с равной вероятностью можно было ожидать как отсутствия значимых изменений относительно соответствующих образцов, не обработанных диамидом, так и замедления или интенсификации потери маркера клетками. Реализация на практике первого варианта развития событий продемонстрировала бы, что криопротекторы модифицируют только липидный бислой и потеря маркера связана с изменением структуры липидов под влиянием криопротекторов. Если же криопротекторы влияют не только на липидный бислой, но и на систему белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе, и через них контролируют изменение параметров CD44, то модификация белков диамидом привела бы ко второму или третьему варианту. Как показали проведенные эксперименты, предварительное окисление белков мембрано-цитоскелетного комплекса диамидом способствовало интенсификации потери CD44 в сравнении с необработанными эритроцитами при аналогичных условиях. Значимое снижение параметров CD44 в эритроцитах, обработанных диамидом, может указывать на возможность реализации влияния криопротекторов на по-

верхностный маркер посредством модификации белок-белковых взаимодействий в системе мембрано-цитоскелетного комплекса в присутствии криопротекторов. Отмечено также, что обработка диамидом препятствует формированию субпопуляции эритроцитов с высоким уровнем экспрессии CD44 в присутствии 30%-ного раствора ПЭГ-1500. Очевидно, это связано с тем, что «сшитые» диамидом белки препятствуют образованию в мембране безбелковых зон, необходимых для слияния двух отдельных мембранных систем (клеток или клеток и везикул). Иными словами, диамиод может стабилизировать липидный бислой через контроль его структуры «сшитыми белками» и усложнять индуцированное ПЭГом слияние мембранных систем. Тем не менее потеря CD44 в эритроцитах, обработанных диамидом, только усиливается в данных условиях, что подтверждает влияние криопротекторов на поверхностный маркер через их влияние на белки мембрано-цитоскелетного комплекса.

Как следует из данных электрофореза, окисление тиоловых групп белков диамидом вовлекало в агрегацию спектрин, белок полосы 3, а также белок с молекулярной массой 60 кДа и белок полосы 8. Результаты электрофореза предполагают возможность изменения динамики белковых взаимодействий между спектрином и белком полосы 3, являющихся неотъемлемыми участниками белковых макрокомплексов, в состав которых входит поверхностный маркер CD44. Следует отметить, что после обработки диамидом в эритроцитах, экспонируемых в присутствии экзоцеллюлярных криопротекторных соединений, изменения параметров CD44 были более значительными по отношению к изменениям, обнаруженным в эритроцитах, экспонированных в средах с эндоцеллюлярными криопротекторами. Очевидно, такие различия связаны с разнотипными механизмами влияния криопротекторов на клетки. Проникая через плазматические мембраны, эндоцеллюлярные вещества вызывают в клетках меньшие структурно-функциональные изменения и оказываются более эффективными для защиты клеток при низкотемпературном хранении. Тот факт, что эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы действительно оказы-

вают различное влияние на белки мембрано-цитоскелетного комплекса, показано на примере эритроцитов животных [61]. Использование диамида для фиксации изменений в структуре белков после обработки эритроцитов ДМСО и ПЭГ-1500 показало, что экзоцеллюлярный криопротектор вызывал существенные изменения в белках мембрано-цитоскелетного комплекса, повышая доступность реагента к тиоловым группам белков, что приводило к усилению индуцированной диамидом агрегации. В то же время ДМСО не влиял значительно на индуцированную диамидом агрегацию белков теней эритроцитов.

Таким образом, вещества эндо- и экзоцеллюлярного типа, обладающие криопротекторными свойствами, при пролонгированной экспозиции с эритроцитами способствуют изменениям в структуре плазматической мембраны, которые ассоциируются со снижением уровня экспрессии поверхностного маркера CD44 и уменьшением количества CD44-позитивных клеток в суспензии. Такие изменения могут быть связаны с возрастной гетерогенностью эритроцитов и, очевидно, затрагивают, в большей степени старые и более зрелые клетки. Экзоцеллюлярные вещества (сахароза и ПЭГ-1500) оказывают более выраженное влияние на CD44 в эритроцитах в сравнении с исследованными веществами эндоцеллюлярного типа (ДМСО и глицеролом). Снижение уровня экспрессии маркера CD44 и уменьшение количества CD44-позитивных клеток в суспензии, обнаруживаемые при пролонгированном воздействии криопротекторов, могут отражать достаточно тонкие перестройки в системе белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов, которые возможны при краткосрочном воздействии и способны влиять на устойчивость клеток в процессе криоконсервирования. Модификация белков мембрано-цитоскелетного комплекса окисляющим бифункциональным реагентом диамидом, способствующая усилению выявленных тенденций в отношении CD44, может служить подтверждением роли изменений белок-белковых взаимодействий в контроле параметров маркера CD44 в эритроцитах при изменении физико-химических свойств клеточного окружения.

EFFECT OF SUBSTANCES
WITH CRYOPROTECTIVE PROPERTIES
ON SURFACE MARKER CD44
IN HUMAN ERYTHROCYTES

N.G. Zemlianskykh

Institute for problems of cryobiology
and cryomedicine of NAS Ukraine, Kharkiv
E-mail: nzemliansky@gmail.com

In this study there were investigated the changes in surface marker CD44 in human erythrocytes exposed to cryoprotective media, as well as the impact of oxidative modification of membrane-cytoskeleton proteins on the CD44 characteristics under the changed physico-chemical parameters of the cellular environment. Glycerol, DMSO, sucrose, and PEG-1500 were shown to cause a decrease in CD44 expression level and amount of CD44-positive cells during prolonged exposure erythrocytes with them. That may reflect subtle adjustments in the system of protein-protein interactions in erythrocyte membrane-cytoskeleton complex, which may affect the stability of cells during cryopreservation. Extracellular substances (sucrose and PEG-1500) exhibited a more pronounced effect on the CD44 in erythrocytes in comparison with the examined substances of endocellular type. Modification of membrane-cytoskeleton proteins with oxidizing bifunctional reagent diamide enhanced the identified tendencies.

ВПЛИВ РЕЧОВИН, ЩО ВОЛОДІЮТЬ
КРІОПРОТЕКТОРНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ,
НА ПОВЕРХНЕВИЙ МАРКЕР CD44
В ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ

Н.Г. Землянських

Досліджено зміни поверхневого маркера CD44 в еритроцитах людини, експонованих в криопротекторних середовищах, і оцінено вплив окисної модифікації білків мембрано-цитоскелетного комплексу на його характеристики при зміні фізико-хімічних параметрів клітинного оточення. Встановлено, що гліцерин, ДМСО, сахароза і ПЕГ-1500 при пролонгованому впливі на еритроцити викликають зниження рівня експресії CD44 та зменшення кількості CD44-позитивних клітин, що відображає досить тонкі перебудови в системі білок-білкових взаємодій в мембрано-цитоскелетному комплексі еритроцитів, які можуть впливати на стійкість клітин в процесі криоконсервування. Екзоцелюлярні речовини (сахароза і ПЕГ-1500) сприяють більш вираженому впливу на CD44 в еритроцитах порівняно з речовинами ендоцелюлярного типу, що були досліджені. Модифікація білків мембрано-цитоскелетного комплексу окислюючим біфункціональним реагентом діамідом сприяє посиленню виявлених тенденцій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Borland, G., Ross, J.A., and Guy, K., Forms and functions of CD44, *Immunology*, 1998, vol. 93, no. 2, pp. 139–148.
2. Telen, M.J., Udani, M., Washington, M.K., Levesque, M.C., Lloyd, E., and Rao N., A blood group-related polymorphism of CD44 abolishes a hyaluronan-binding consensus sequence without preventing hyaluronan binding, *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, no. 12, pp. 7147–7153.
3. Rudzki, Z., and Jothy, S., CD44 and the adhesion of neoplastic cells, *Mol. Pathol.*, 1997, vol. 50, no. 2, pp. 57–71.
4. Telen, M.J., Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all, *Blood*, 1995, vol. 85, no. 2, pp. 299–306.
5. Xu, Z., Duffett, L., Tokessy, M., Cote, J., Goldman, M., and Saidenberg, E., Anti-AnWj causing acute hemolytic transfusion reactions in a patient with aplastic anemia, *Transfusion*, 2012, vol. 52, no. 7, pp. 1476–1481.
6. Telen, M.J., Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease, *Semin. Hematol.*, 2000, vol. 37, no. 2, pp. 130–142.
7. Hale, L.P., Singer, K.H., and Haynes, B.F., CD44 antibody against In(Lu)-related p80, lymphocyte-homing receptor molecule inhibits the binding of human erythrocytes to T cells, *J. Immunol.*, 1989, vol. 143, no. 12, pp. 3944–3948.
8. Funaro, A., Spagnoli, G.C., Momo, M., Knapp, W., and Malavasi, F., Stimulation of T cells via CD44 requires leukocyte-function-associated antigen interactions and interleukin-2 production, *Hum. Immunol.*, 1994, vol. 40, no. 4, pp. 267–278.
9. van den Akker, E., Satchwell, T.J., Pellegrin, S., Flatt, J.F., Maigre, M., Daniels, G., Delaunay, J., Bruce, L.J., and Toye, A.M., Investigating the key membrane protein changes during in vitro erythropoiesis of protein 4.2 (–) cells (mutations Chartres 1 and 2), *Haematologica*, 2010, vol. 95, no. 8, pp. 1278–1286.
10. Gwamaka, M., Fried, M., Domingo, G., and Duffy, P.E., Early and extensive CD55 loss from red blood cells supports a causal role in malarial anaemia, *Malar. J.*, 2011, vol. 10, p. 386.
11. Gottlieb, Y., Topaz, O., Cohen, L.A., Yakov, L.D., Haber, T., Morgenstern, A., Weiss, A., Berman, K.C., Fibach, E., and Meyron-Holtz, E.G., Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro, *Haematologica*, 2012, vol. 97, no. 7, pp. 994–1002.
12. Dinkla, S., Novotný, V.M., Joosten I., and Bosman, G.J., Storage-induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies, *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8, e42250.
13. Karon, B.S., van Buskirk, C.M., Jaben, E.A., Hoeyer, J.D., and Thomas, D.D., Temporal sequence of

- major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells, *Blood Transfus.*, 2012, vol. 10, no. 4, pp. 453–461.
14. Sun, H., Glasmacher, B., and Hofmann, N., Compatible solutes improve cryopreservation of human endothelial cells, *Cryo Lett.*, 2012, vol. 33, no. 6, pp. 485–493.
 15. Baert, Y., Van Saen, D., Haentjens, P., In't Veld, P., Tournaye, H., and Goossens, E., What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum. Reprod.*, 2013, vol. 28, no. 7, pp. 1816–1826.
 16. Pallotta, V., D'Amici, G.M., D'Alessandro, A., Rossetti, R., and Zolla, L., Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization, *Blood Cells Mol. Dis.*, 2012, vol. 48, no. 4, pp. 226–232.
 17. Yang, B., Liu, B.L., Zhou, X.L., Shen, L., and Huang, D.H., Enhanced metabolic function of human hepatocytes cryopreserved with low concentration Me₂SO and polyol additives at – 80 C, *Cryo Lett.*, 2013, vol. 34, no. 4, pp. 381–387.
 18. Lee, Y.A., Kim, Y.H., Ha, S.J., Kim, B.J., Kim, K.J., Jung, M.S., Kim, B.G., and Ryu, B.Y., Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells, *Fertil. Steril.*, 2014, vol. 101, no. 4, pp. 1165–1175.
 19. Stoll, C., Holovati, J.L., Acker, J.P., and Wolkers, W.F., Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch for cryopreservation of human erythrocytes, *Biotechnol. Prog.*, 2012, vol. 28, no. 2, pp. 364–371.
 20. Lee, Y.A., Kim, Y.H., Kim, B.J., Kim, B.G., Kim, K.J., Auh, J.H., Schmidt, J.A., and Ryu, B.Y., Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine spermatogonial stem cells, *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 1, e54889.
 21. Feuerecker, M., Kaufmann, I., Salam, A.P., and Choukir, A., Effects of cryopreservation with polyethylene glycol on the expression of CD11b and CD62L on the surface of polymorphonuclear leukocytes, *Cryo Lett.*, 2012, vol. 33, no. 2, pp. 151–160.
 22. El-Shewy, H.M., Kendall, W.F.Jr., Darrabie, M., Collins, B.H., and Opara, E.C., Polyvinyl pyrrolidone: a novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation, *Cell Transplant.*, 2004, vol. 13, no. 3, pp. 237–243.
 23. Deuticke, B., Poser, B., Lutkemeier, P., and Haest, C.W., Formation of aqueous pores in the human erythrocyte membrane after oxidative cross-linking of spectrin by diamide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, vol. 731, no. 2, pp. 196–210.
 24. Fischer, T.M., Haest, C.W., Stohr, M., Kamp, D., and Deuticke, B., Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents: evident for an involvement of spectrin in membrane shear elasticity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, vol. 510, no. 2, pp. 270–282.
 25. Haest, C.W., Kamp, D., and Deuticke, B., Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1981, vol. 643, no. 2, pp. 319–326.
 26. Fairbanks, G., Steck, T.L., and Wallach, D.F., Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry*, 1971, vol. 10, no. 13, pp. 2606–2617.
 27. Parsons S.F., Jones J., Anstee D.J., Judson P.A., Gardner B., Wiener E., Poole J., Illum N., and Wickramasinghe, S.N., A novel form of congenital dyserythropoietic anemia associated with deficiency of erythroid CD44 and a unique blood group phenotype [In(a–b–), Co(a–b–)], *Blood*, 1994, vol. 83, no. 3, pp. 860–868.
 28. Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quattannens, B., Tissier, J.P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.J., Montreuil, J., and Ameisen, J.C., Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria, *Cell Death Differ.*, 2001, vol. 8, no. 12, pp. 1143–1156.
 29. Lang, P.A., Huober, J., Bachmann, C., Kempe, D.S., Sobiesiak, M., Akel, A., Niemoeller, O.M., Dreischer, P., Eisele, K., Klarl, B.A., Gulbins, E., Lang, F., and Wieder T., Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel, *Cell Physiol. Biochem.*, 2006, vol. 18, no. 1–3, pp. 151–164.
 30. Lang, K.S., Myssina, S., Lang, P.A., Tanneur, V., Kempe, D.S., Mack, A.F., Huber, S.M., Wieder, T., Lang, F., and Duranton C., Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl[–], *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2004, vol. 286, no. 6, pp. F1046–F1053.
 31. Lang, P.A., Kempe, D.S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., Lang, F., Wieder, T., and Huber, S.M., PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death, *Cell Death Differ.*, 2005, vol. 12, no. 5, pp. 415–428.
 32. Zancan, P., and Sola-Penna, M., Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, vol. 444, no. 1, pp. 52–60.
 33. Olsen, S.N., Ramløv, H., and Westh, P., Effects of osmolytes on hexokinase kinetics combined with macromolecular crowding: Test of the osmolyte compatibility hypothesis towards crowded systems, *Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol.*, 2007, vol. 148, no. 2, pp. 339–344.
 34. Esmann, M., Fedosova, N.U., and Marsh, D., Osmotic stress and viscous retardation of the Na,K–ATPase ion pump, *Biophys. J.*, 2008, vol. 94, no. 7, pp. 2767–2776.
 35. Lehtonen, J.Y., and Kinnunen, P.K., Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes, *Biophys. J.*, 1995, vol. 68, no. 2, pp. 525–535.
 36. Malajczuk, C.J., Hughes, Z.E., and Mancera, R.L., Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO, mono- and polyhydroxylated cryosolvents with a hydrated phospholipid bilayer, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, vol. 1828, no. 9, pp. 2041–2055.
 37. Ragoonanan, V., Hubel, A., and Aksan, A., Re-

- sponse of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses, *Cryobiology*, 2010, vol. 61, no. 3, pp. 335–344.
38. Timasheff, S.N., Solvent stabilization of protein structure, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 40. Protein Stability and Folding, ed. B.A. Shirley, Totowa, Humana Press, 1995, pp. 253–269.
 39. Carpenter, J.F., and Crowe, J.H., The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes, *Cryobiology*, 1988, vol. 25, no. 3, pp. 244–255.
 40. Konov, K.B., Isaev N.P, and Dzuba, S.A., Low-temperature molecular motions in lipid bilayers in the presence of sugars: insights into cryoprotective mechanisms, *J. Phys. Chem. B*, 2014, vol. 118, no. 43, pp. 12478–12485.
 41. Zhao, W.Y., Xiong, H.Y., Yuan, Q., Zeng, L., Wang, L.M., and Zhu, Y.H., In vitro effects of polyethylene glycol in University of Wisconsin preservation solution on human red blood cell aggregation and hemorheology, *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2011, vol. 47, no. 3, pp. 177–185.
 42. Lentz, B.R., PEG as a tool to gain insight into membrane fusion, *Eur. Biophys. J.*, 2007, vol. 36, no. 4–5, pp. 315–326.
 43. Maggio, B., Ahkong, Q.F., and Lucy, J.A., Poly(ethylene glycol), surface potential and cell fusion, *Biochem. J.*, 1976, vol. 158, no. 3, pp. 647–650.
 44. Ahkong, Q.F., Desmazes, J.P., Georgescauld, D., and Lucy, J.A., Movements of fluorescent probes in the mechanism of cell fusion induced by poly(ethylene glycol), *J. Cell Sci.*, 1987, vol. 88, Pt. 3, pp. 389–398.
 45. Igljic, A., Veranic, P., Jezernik, K., Fosnaric, M., Kamin, B., Hägerstrand, H., and Kralj-Igljic, V., Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes, *Bioelectrochemistry*, 2004, vol. 62, no. 2, pp. 159–161.
 46. Holovati J.L., Wong, K.A., Webster, J.M., and Ackler, J.P., The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression, *Transfusion*, 2008, vol. 48, no. 8, pp. 1658–1668.
 47. Jank, H., and Salzer, U., Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils, *Sci. World J.*, 2011, vol. 11, pp. 173–185.
 48. Bosman, G.J., Lasonder, E., Groenen-Döpp, Y.A., Willekens, F.L., and Were, J.M., The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation, *J. Proteomics*, 2012, vol. 76, Spec. no., pp. 203–210.
 49. Kucukatay, V., Bor-Kucukatay, M., Gundogdu, G., Erken, G., Ozcan, T.O., Miloglu, F.D., and Kadioglu, Y., Vitamin E treatment enhances erythrocyte deformability in aged rats, *Folia Biol. (Praha)*, 2012, vol. 58, no. 4, pp. 157–165.
 50. Celedyn, G., González, G., Barrientos, D., Pino, J., Venegas, F., Lissi, E.A., Soto, C., Martinez, D., Alvarez, C., and Lanio, M.E., Stycolysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* promotes higher hemolysis in aged red blood cells, *Toxicon*, 2008, vol. 51, no. 8, pp. 1383–1390.
 51. Jakubowska-Solarska, B., and Solski, J., Sialic acids of young and old red blood cells in healthy subjects, *Med. Sci. Monit.*, 2000, vol. 6, no. 5, pp. 871–874.
 52. Westh, P., Unilamellar DMPC vesicles in aqueous glycerol: preferential interactions and thermochemistry, *Biophys. J.*, 2003, vol. 84, no. 1, pp. 341–349.
 53. Sum, A.K., and de Pablo, J.J., Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers, *Biophys. J.*, 2003, vol. 85, no. 6, pp. 3636–3645.
 54. Nunomura, W., Takakuwa, Y., Tokimitsu, R., Krauss, S.W., Kawashima, M., and Mohandas, N., Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction, *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 48, pp. 30322–30328.
 55. Jeremy, K.P., Plummer, Z.E., Head, D.J., Madgett, T.E., Sanders, K.L., Wallington, A., Storry, J.R., Gilsanz, F., Delaunay, J., and Avent, N.D., 4.1R-deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins, *Haematologica*, 2009, vol. 94, no. 10, pp. 1354–1361.
 56. Kofanova, O.A., Zemlyanskikh, N.G., Ivanova, L., and Bernhardt, I., Changes in the intracellular Ca²⁺ content in human red blood cells in the presence of glycerol, *Bioelectrochemistry*, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 151–154.
 57. Kucherenko, Y.V., and Bernhardt, I., The study of Ca²⁺ influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media, *Ukr. Biokhim. Zh.*, 2006, vol. 78, no. 6, pp. 46–52.
 58. Zemlyanskikh, N.G., and Kofanova, O.A., Modulation of human erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin, *Biochemistry (Mosc)*, 2006, vol. 71, no. 8, pp. 900–905.
 59. Zemlyanskikh, N.G., and Khomenko, M.V., Human erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity in hypertonic media at low and physiological temperatures, *Biol. Membrany*, 2006; vol. 23, no. 5, pp. 375–383.
 60. An, X.L., Takakuwa, Y., Nunomura, W., Manno, S., and Mohandas, N., Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1. Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties, *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, no. 52, pp. 33187–33191.
 61. Zemlianskikh, N.G., and Denisova, O.N., Changes in erythrocyte membrane-cytoskeleton complex, induced by dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol, and low temperature, *Biofizika*, 2009, vol. 54, no. 4, pp. 693–703.

Поступила 03.05.14