

О. М. Денисова, Н.Г. Землянських, Г.Ф. Жегунов

Зміни складу білків мембранно-цитоскелетного комплексу еритроцитів ссавців при кріоконсервуванні

Оценен состав белков мембраны и цитоскелета эритроцитов лошади, быка и собаки под влиянием криопротекторов и замораживания – отогрева методом электрофореза в полиакриламидном геле. Выявлены видовые особенности эритроцитов в норме. Не обнаружено количественных и качественных отличий в исследованных объектах по основным структурным белкам во всех экспериментальных вариантах. Незначительные изменения в процессе кріоконсервирования отмечались в эритроцитах быка, где происходило снижение белка полосы б. Это может быть связано с криостабильностью белков или недостаточной чувствительностью метода.

ВСТУП

Переливання крові – актуальний метод лікування у ветеринарії, який використовується при травматологічних і хірургічних кровотечах, а також для терапевтичної підтримки киснетранспортної функції крові при розвитку анемічного стану у рідкісних видів або окремих тварин [7, 22]. Відсутність донора в потрібний момент може призвести до загибелі тварини, тому для вирішення цієї проблеми необхідна розробка способів кріоконсервування еритроцитів.

Головна функція еритроцитів – транспорт кисню від легенів до тканин і вуглекислого газу у зворотному напрямку. Процес транспортування газів пов'язаний з функцією гемоглобіну, який є основним компонентом без'ядерної клітини та обмежений плазматичною мембраною. Мембрани еритроцитів здатні протистояти значній деформації в капілярній системі або в аорті, де за умов норми виникає турбулентний потік крові. Ця властивість плазматичної мембрани забезпечує збереження цілісності клітин при циркуляції еритроцитів

у кровоносному руслі [23]. У дослідженнях, проведених у 70-х роках, було показано, що біологічні мембрани – найбільш кріочутливі структури клітин [3, 4, 24].

Мембранні білки еритроцитів поділяються на інтегральні (білок смуги 3 і глікофорини) та периферичні (спектрин, актин, білки смуг 2.1, 4.1, 4.2, 4.5, 4.9, 6, 7). Останні формують цитоскелет, який забезпечує стабільність і пластичність мембран еритроцитів [11, 23]. У мікроциркуляторному руслі відбуваються модифікації форми та лінійних розмірів клітин при однаковій площі поверхні мембрани, що супроводжуються зміною розташування молекул спектрину на внутрішній поверхні ліпідного бішару та процесами дисоціації-реасоціації окремих молекул у комплексі білок-білкових взаємодій, які формують мережу цитоскелета [12]. При значних зрушеннях і, відповідно, значних деформаціях мембрани або в умовах різкої зміни фізико-хімічних показників середовища може відбутися розрив цитоскелетної структури в місцях взаємодії молекул спектрину (межа стабільності мембрани),

© О. М. Денисова, Н.Г. Землянських, Г.Ф. Жегунов

який призводить до фрагментації мембран еритроцитів [23].

Мета нашої роботи – дослідити зміни складу білків мембран і цитоскелета еритроцитів крові коня, бика та собаки, що були кріоконсервовані з екзоцелюлярним (ПЕГ-1500) і ендоцелюлярним (ДМСО) кріопротекторами.

МЕТОДИКА

У дослід брали еритроцити здорових статевозрілих самців коня, бика та собаки. Тварини були імунізовані, вільні від паразитів. Кров у коня (віком 5–13 років) і бика (віком 2–4 років) забирали з яремної вени, у собаки (віком 2–10 років) з плечової вени за допомогою венепункції [6]. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1985 р.)

При заборі кров у тварин використовували глюкозо-цитратному консервант. Кров зберігали до кріоконсервування не більше ніж 48 год при 4 °С. Еритроцити перед проведенням експерименту центрифугували при 350 g і тричі промивали ізотонічним сольовим розчином (0,9%-й NaCl).

Для кріоконсервування еритроцитів тварин використовували:

1) ДМСО – 20 %; NaCl – 0,9 %; фосфатного буфера – 5 ммоль/л; рН 7,4 [9]; 2) ПЕГ-1500 – 30 %; NaCl – 0,9 %; фосфатного буфера – 5 ммоль/л; рН 7,4 [1, 9].

Кріоконсервант на основі проникного кріопротектора ДМСО додавали до еритроцитів при 22 °С у співвідношенні 1:1 за об'ємом. Кріоконсервант на основі непроникного кріопротектора ПЕГ-1500 додавали до клітинної суспензії при 2–4 °С у співвідношенні 1:1 за об'ємом. Заморожування здійснювали зануренням металевих контейнерів у рідкий азот (-196 °С). Відігрів після низькотемпературного зберігання проводили на водяній бані при 42–45 °С. Проникний кріопротектор видаляли серій-

ним центрифугуванням [10]. На першому етапі до суспензії відігрітих еритроцитів додавали однаковий об'єм гіпертонічного сольового розчину, що містить 3,5 % NaCl, рН 7,4. Після цього еритроцити двічі промивали ізотонічним сольовим розчином (0,9%-й NaCl, рН 7,4).

Модифікацію білків мембранно-цитоскелетного комплексу, яка індукована кріопротекторами і низькою температурою, оцінювали методом електрофорезу. Для цього отримували білі тіні еритроцитів гіпотонічним шоком [16]. З цією метою клітини лізували при 2 °С розчином такого складу: натрій-фосфатного буфера – 10, рН 8,0; фенілметилсульфонілфлуориду – 0,1; азиду натрію – 0,3. Співвідношення об'ємів клітинної суспензії і лізуючого розчину становило 1:30. На рефрижераторній центрифугі К-24 (“VEB MLW Zentrifugenban”, Німеччина) мембрани відмивали від гемоглобіну при 14000 g протягом 10 хв. Аліквоти тіней фіксували в буфері такого складу: тріс-НСІ – 0,05 моль/л; NaN₃ – 0,4 мг/мл; ЕДТА – 0,003 моль/л; додецилсульфату натрію – 2 %; гліцерину – 20 %; бромфенолового синього – 0,01 %; PMSF – 0,7 мг/мл) в співвідношенні 1:1 за об'ємом; рН 6,8. Білки додатково денатурували нагріванням до 100 °С протягом 3–5 хв. Концентрація білка в білих тінях, яку визначали за методом Бредфорда [14] була в межах 3–5 мг/мл.

Електрофорез білків проводили в плоских вертикальних SDS-поліакріламідних гелях за системою Лемлі [16]. Використовували градієнтний гель 5–20T4C [8]. Зразки наносили по 20–25 мкл у комірки стартового гелю. Кінцева концентрація білка в зразках становила 1–2 мг/мл. Білки розділяли протягом 12–15 год при силі струму 25 мА та 4 °С, після чого гелі фіксували у 10%-му ТХУ протягом 2 год. Фарбували їх барвником Coomassie R-250 при кімнатній температурі протягом 2–3 год. Надлишок фарбника декілька раз відмивали розчином 7%-ї оцтової кислоти.

Ідентифікацію білків проводили відповідно до набору стандартів маркерних білків фірми “Fluka”:

29000 кДа – еритроцитарна карбоангідраза бика;

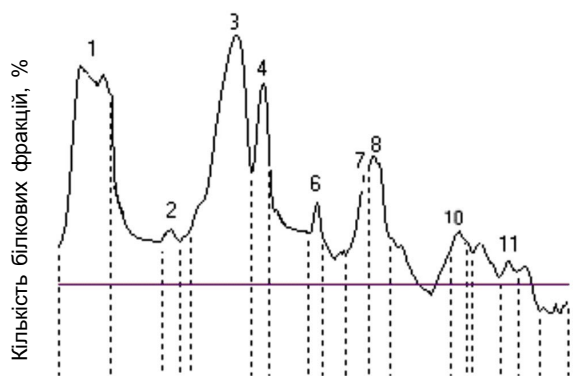
45000 кДа – карбоангідраза яєчного білка;

66000 кДа – бичачий сироватковий альбумін;

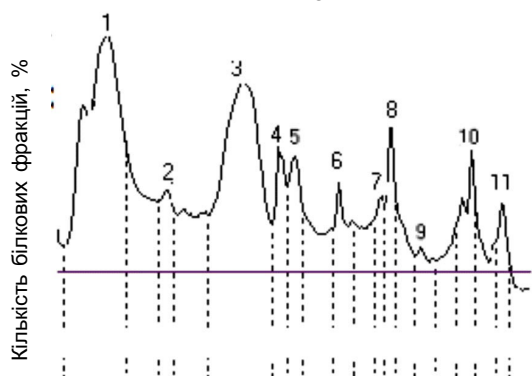
97400 кДа – β -галактозидаза E.coli;

20500 кДа – міозин м'яза кролика.

Відносну кількість білків різних фракцій на доріжці SDS – поліакриламідний гель за допомогою денситометра DM2120 “Solar” і комп'ютерної програми Scion Image. Результати виражали в відсотках до загального вмісту білків.



а

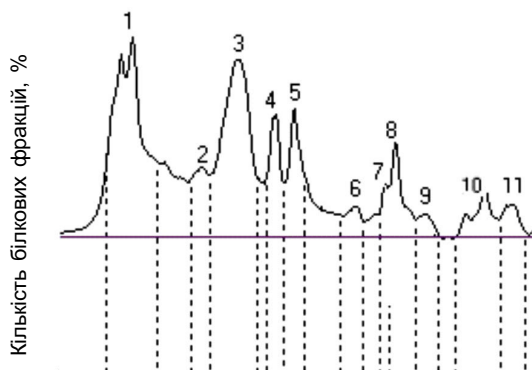


б

Статистичну обробку результатів проводили за методом Ст'юдента-Фішера [2]. Для розрахунків використовували комп'ютерну програму “Stat Graphics”. Кількість експериментів у кожній серії дослідів була не менше ніж п'ять.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Денситометричний аналіз мембранних білків нативних еритроцитів представлено на рисунку. Білковий спектр має загальну картину для всіх видів досліджуваних ссавців. Видові відмінності у структурі мембранно-цитоскелетного комплексу еритроцитів досліджуваних тварин, які були встановлені [18], знайшли своє підтвердження також і у нашій роботі. Зокрема, в еритроцитах коня було виявлено дефіцит білків смуг 4.2 та 6, а білків 4.9 і 7 було значно більше. Структурна роль білка смуги 4.2 в еритроцитах, як вважають



в

Денситометричний аналіз мембранних фракцій нативних еритроцитів крові коня (а), бика (б), собаки (с): 1 – спектрин; 2 – анкірин; 3 – білок смуги 3; 4 – білок смуги 4.1; 5 – білок смуги 4,2; 6 – білок смуги 4.5; 7 – білок смуги 4.9; 8 – білок смуги 5; 9 – білок смуги 6; 10 – зона білків смуг 7; 11 – білок смуги 8. Вміст білка кожної фракції представлено як відсоткове відношення від загального вмісту. За віссю абсцис – спектр білкових фракцій тіней еритроцитів з молекулярними масами 270000–10000 Да

автори [15, 20], пов'язана з утворенням вертикальних зв'язків між цитоскелетом і елементами власне плазматичної мембрани. Цей білок бере участь в об'єднанні цитоплазматичного домену білка смуги 3, анкірину, спектрину і білка смуги 4.1. Можливо, що фізіологічна відсутність білка смуги 4.2 може бути компенсована більшою концентрацією анкірину – основного якірного білка в мембранно-цитоскелетному комплексі [17]. Структурні особливості в організації цитоскелетної мережі еритроцитів досліджених видів тварин можуть визначати різну резистентність клітин до низькотемпературного впливу. Раніше ми показали [5], що еритроцити крові коня в порівнянні з такими бика та собаки є менш стійкими до стресових процесів кріоконсервування. У розвитку механізмів кріопшкодження значну роль відіграють осмотичні процеси [19, 25]. Вища кріочутливість еритроцитів коня може бути пов'язана з відсутністю білка смуги 4.2 в регуляції осмотичної поведінки клітин. Таке припущення базується на даних праці [21], де описано випадок генетичного дефекту цитоскелета еритроцитів у мишей, пов'язаного з повною втратою білка смуги 4.2, що призводило до порушення транспорту іонів і дестабілізації еритроцитів [21].

Наступний етап роботи пов'язаний з оцінкою змін у структурі мембранно-цитоскелетного комплексу еритроцитів тварин під впливом кріоконсервування (див. таблицю). В еритроцитах, які були кріоконсервовані під захистом ДМСО і ПЕГ-1500, не виявляються зміни, що спричиняють перерозподіл окремих фракцій у білковому спектрі порівняно з контрольними клітинами. Єдиним винятком зі встановленої закономірності є білок смуги 6 в еритроцитах крові бика, в яких доведено зниження вмісту цього білка після низькотемпературного зберігання клітин під захистом даних кріопротекторів. Така особливість еритроцитів крові бика може бути пов'язана з видовими відмінностями в первинній структурі білка смуги 6 або 3. Білок смуги 6

в еритроцитах крові людини є гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою, фермент гліколізу. При дослідженні білків мембран еритроцитів людини, які були заморожені до -60°C методом електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі, було встановлено, що мембрани із відігрітих після замороження еритроцитів містили значно меншу кількість гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, ніж мембрани з незаморожених клітин. Експерименти [13] з інкубації еритроцитів в 3 моль/л NaCl показали, що втрата білка смуги 6 пов'язана з порушенням у розчині високої іонних зв'язків у концентрованих електролітних розчинах, які зумовлюють прикріплення мембранного білка. Можна припустити, що підвищення концентрації солі при заморожуванні призводить до конформаційних змін структури білка смуги 6, внаслідок чого втрачаються сайти, що забезпечують його асоціацію з білком смуги 3. Так само зменшення кількості білка смуги 6 в мембранно-цитоскелетному комплексі за таких умов може бути зумовлено і зміною в структурі білка смуги 3, в цитоплазматичному домені якого знаходяться сайти взаємодії з різними ферментами гліколітичного циклу.

ВИСНОВКИ

Результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що білковий спектр мембрани еритроцитів тварин після обробки кріопротекторами і подальшого їх кріоконсервування якісно не змінюється (не відбувається випадання або утворення нових смуг). Можливо, модифікації білок-білкових взаємодій, які викликані різними змінами показників навколишнього середовища мембранно-цитоскелетного комплексу еритроцитів, не можуть бути ідентифіковані через обмежені можливості методу. Разом з тим можна допустити, що відсутність виражених змін у структурній організації мембранних білків при дії низьких температур пов'язана з їх кріостабільністю.

Кількість окремих фракцій білків у мембранах еритроцитів крові тварин у процесі кріоконсервування з різними кріопротекторами (M±m; n = 5–6)

Білкові фракції	Еритроцити крові коня			Еритроцити крові бика			Еритроцити крові собаки		
	Контроль	Після кріоконсервування з		Контроль	Після кріоконсервування з		Контроль	Після кріоконсервування з	
		ПЕГ-1500	ДМСО		ПЕГ-1500	ДМСО		ПЕГ-1500	ДМСО
Спектрин (білок смуги Іі2)	20,15±0,82	19,45±0,82	20,83±0,55	26,04±1,49	25,76±2,3	25,37±0,42	22,99±0,5	23,72±1,16	22,86±0,55
Анкірин (білок смуги 2.1)	2,68±0,2	2,89±0,74	3,03±0,66	3,20±0,24	2,56±0,32	3,79±0,34	3,68±0,24	3,08±0,48	3,65±0,33
Білок смуги									
3	23,33±0,46	20,25±0,39	21,03±0,67	21,55±0,4	19,82±0,12	20,54±1,51	19,18±0,1	18,56±0,21	18,1±0,46
4.1	6,48±0,38	6,13±0,56	6,52±0,3	4,28±0,21	4,12±0,05	4,57±0,26	4,81±0,22	5,2±0,42	5,34±0,52
4.2	-	-	-	4,17±0,15	4,23±0,215	3,94±0,13	4,78±0,48	5,01±0,15	4,9±0,7
4.5	2,7±0,54	2,54±0,44	2,34±0,13	2,77±0,41	2,62±0,26	2,57±0,13	2,51±0,08	1,6±0,54	1,58±0,08
4.9	3,64±0,16	3,87±0,19	3,87±0,19	2,12±0,25	1,64±0,18	1,86±0,29	1,24±0,08	1,39±0,02	1,48±0,23
5	4,76±0,3	4,19±0,42	4,37±0,4	2,72±0,21	2,75±0,12	2,57±0,27	3,23±0,5	2,27±0,4	3,65±0,78
6	-	-	-	1,29±0,05	0,53±0,23*	0,68±0,11*	1,29±0,28	1,8±0,76	1,44±0,18
7	4,54±0,19	3,64±0,45	4,37±0,32	3,27±0,59	3,46±0,24	3,85±0,4	3,67±0,42	3,44±0,4	4,2±0,104
8	0,46±0,08	0,85±0,24	0,45±0,27	1,20±0,24	0,96±0,26	1,7±0,6	2,33±0,24	1,6±0,41	2,07±0,19

Примітка. Одержані результати представлено у відсотках відносно загальної кількості білка у мембрані. Класифікація згідно з [16] у модифікації для еритроцитів тварин [18]. *P< 0,05.

O. Denysova, N. Zemlyanskikh, G. Zhegunov

CHANGES IN PROTEIN COMPOSITION OF MEMBRANE-CYTOSKELETAL COMPLEX IN MAMMALIAN ERYTHROCYTES UNDER CRYOPRESERVATION

Protein composition of mammalian erythrocyte membrane-cytoskeletal complex under the influence of cryoprotectants and freezing-thawing process was studied by the methods of electrophoresis. No quantitative and qualitative differences in the research objects on basic structural proteins in all experimental variants were revealed. Slight changes in cryopreservation process were noted in bovine erythrocytes, where there was a reduction of protein band 6. This may be related to either cryostability of protein or insufficient sensitivity of the method.

Kharkiv, zooveterinary academy

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабійчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М. Новий метод криоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія. – 2000. – 1, № 1. – С. 296–298.
2. Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: Мир, 1963. – 71 с.
3. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – К.: Наук. думка, 1982. – 255 с.
4. Гулевский А.К. Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1986. – 42 с.
5. Жегунов Г.Ф., Денисова О.Н., Землянских Н.Г. Криоконсервирование и сохранность эритроцитов животных // Проблемы криобиологии. – 2005. – 3, №3. – С. 566–569.
6. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Клиническая гематология животных. – М.: Колос, 1974. – 398 с.
7. Мокеев И. Н. Инфузионно-трансфузионная терапия: Справочник. – М., 1998. – 232 с.
8. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.
9. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – К.: Наук. думка, 1978. – 204 с.
10. Семенова Н.В., Федорова Л.И., Виноградов В.Л. и др. Сравнительное изучение криоконсервированных эритроконцентратов при различных способах их отмывания // Гематология и трансфузиол. – 1986. – № 10. – С. 42–52.
11. Черницкий Е.А., Воробей А.Б. Структура и функ-

ция эритроцитарных мембран.- Минск: Наука и техника, 1981. – 213 с.

12. An X., Lecomte M.C., Chasis J.A. et al. Shear-response of the spectrin dimer-tetramer equilibrium in the red blood cell membrane // J.Biol.Chem. – 2002. – 277, № 35. – P. 31796–31800.
13. Ballas S.K. Red cell membrane protein in change caused by freezing and mechanism of cryoprotection by glycerol // Transfusion. – 1981. – 21, № 2. – P. 203–210.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
15. Bruce L.J., Becrmann R., Ribeiro M.L. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // Blood. – 2003. – 101, №10. – P. 4180–4188.
16. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Electrolytic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – 10. – P. 2606–2617.
17. Guerra-Shinohara E.M., Barretto O.C. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species // Braz. J. Med. Biol. Res. – 1999. – 32, №6. – P. 683–687.
18. Matei H., Frentescu L., Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // J. Cell. Mol. Med. – 2000. – 4, № 4. – P. 270–276.
19. Muldrew K., McGann L.E., The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing // Cryobiology. – 1993. – 30. – P. 620.
20. Nicola V., Le Van Kim C., Gane P. et al. Rh-RhAG/ankirin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh - associated mutation // J.Biol.Chem. – 2003. – 278, – №28. – P. 25526–25533.
21. Peters L.L., Jindel Y.K., Gwynn B. et al. Mild spherocytosis and altered red cell ion transport in protein 4. 2-null mice // J. Clin. Invest. – 1999 – 11. – P. 1527–1537.
22. Scott K.L., Lecal J., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present and future // Trans. Med. Reviews. – 2005. – 19, №2. – P. 127–142.
23. Shohet S.B. Possible roles for the membrane cytoskeleton in regulation red cell stability and deformability // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. – 1981. – 156. – P. 123–130.
24. Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A. et al. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // Cryobiology. – 2002. – 45. – P. 153–166.
25. Walson P.F., Kunze E., Cramer P., Hammerstedt R.H. A comparison of critical osmolarity and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa // J.Androl. – 1992. – 13. – P. 131–138.

Матеріал надійшов до редакції 16.04.2007

Харків. зооветеринарна академія