

Зміни поверхневого маркера CD44 еритроцитів при гіпотермічному та низькотемпературному зберіганні

Н.Г. Землянських, Л.О. Бабійчук

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, e-mail: nina_zemlya@mail.ru

У роботі досліджено зміни поверхневого маркера CD44 в еритроцитах, які кріоконсервовали за наявності гліцерину та ПЕГ-1500 або зберігали в гіпотермічних умовах. Показано, що при гіпотермічному зберіганні характеристики CD44 в суспензії еритроцитів не змінювалися впродовж 10 діб. У кріоконсервованих еритроцитах відзначалося зниження кількості CD44⁺-клітин і рівня експресії поверхневого маркера. Використання ПЕГ-1500 призводило до більш виражених змін характеристик CD44 в еритроцитах після розморожування порівняно з гліцерином. Видалення кріопротекторів і втрата частини клітин в процесі відмивання призвели до відновлення характеристик CD44 в суспензії розморожених еритроцитів, які успішно пережили стрес. Отримані результати свідчать, що в кріоконсервованих еритроцитах виявлені зміни охоплюють тільки частину клітин, і асоціюються з нестабільністю популяції еритроцитів із зміненими характеристиками CD44, оскільки після видалення кріопротекторів із супутнім гемолізом нестабільних клітин, показники CD44 в еритроцитарній суспензії відновлювалися. Механізми, що лежать в основі змін параметрів поверхневого маркера CD44 в розморожених еритроцитах, можуть бути пов'язані з порушенням міжмолекулярних взаємодій у мембрані під впливом фізико-хімічних факторів середовища, і процесом везикуляції мембран з включенням білків CD44 до складу везикул.

Ключові слова: еритроцит; мембрана; CD44; заморозування; кріопротектор.

ВСТУП

Зміни поверхневих мембранних маркерів при старінні, гіпотермічному зберіганні та розвитку патофізіологічних процесів в еритроцитах, корелюють зі зниженням життєздатності та стабільності клітин [1, 2]. Вочевидь, поверхневі характеристики віддзеркалюють структурно-функціональні перебудови мембран, які викликані різними стресовими факторами. Відомо, що в еритроцитах стабільність мембрани значною мірою залежить від білків цитоскелета, пов'язаного точковими контактами з окремими інтегральними білками або білковими комплексами, до складу яких входить поверхневий маркер CD44. Останній являє собою молекулу адгезії, яка опосередковує зв'язок клітин з гіалуроновою кислотою та іншими компонентами позаклітинного матриксу [3, 4]. В еритроцитах CD44 представлений стандартною

ізоформою (CD44s), яка також називається гемопоетичною (CD44H), та презентує антигени двох різних систем груп крові: AnWj і In a/b [5, 6]. У нормі еритроцити людини не виявляють адгезивної активності, але залучені в розвиток патофізіологічних процесів, пов'язаних з вазооклюзивними станами при серпоподібноклітинній анемії, спадковому сфероцитозі та інших захворюваннях [7]. Існують докази участі CD44-еритроцитів в міжклітинній сигналізації, спрямованій на стимуляцію лімфоцитів і моноцитів [8, 9] і видалення з організму чужорідних об'єктів і апоптозних клітин. Зв'язок CD44 з цитоскелетом в еритроцитах, вочевидь, може відігравати певну роль у модуляції механоеластичних властивостей мембрани. Це побічно підтверджується тим, що за наявності генетичної модифікації, яка призводить до повної втрати цитоскелетного білка смуги

4.2 і супроводжується підвищенням асоціації CD44 з цитоскелетом, спостерігається відносно м'який фенотип анемії [10].

Зважаючи на різноманітність функцій CD44 в еритроцитах, його зміни в процесі гіпотермічного (2–5°C) та низькотемпературного зберігання (–196°C), ймовірно, важливі для нормального функціонування клітин в руслі крові. У зв'язку з вищенаведеним, дослідження характеристик поверхневого мембранного маркера CD44 після зберігання еритроцитів можуть бути вирішальними як для оцінки структурно-функціональної повноцінності клітин, так і розуміння механізмів, які відповідальні за їх пошкодження в екстремальних умовах.

Збереженість клітин при низьких температурах забезпечують ендо- та екзоцелюлярні кріопротектори, які реалізують захисні властивості, проникаючи в клітини або залишаючись у позаклітинному середовищі. Нині розроблені різні способи кріоконсервування еритроцитів, які відрізняються різною температурою зберігання, швидкостями заморожування та компонентами консервуючих розчинів. Практично всі вони базуються на використанні ендоцелюлярного кріопротектора гліцерину. Він гарантує високу збереженість еритроцитів у процесі кріоконсервування як при –80°C, так і при більш низьких температурах (до –196°C) [11]. Проте використання ендоцелюлярного кріопротектора передбачає його видалення з клітин після розморожування, що вимагає додаткових витрат. Тому екзоцелюлярні кріопротектори викликають значний інтерес у дослідників [12, 13], оскільки на їх основі можуть бути створені безвідмивні технології кріоконсервування. Перспективним екзоцелюлярним кріопротектором для еритроцитів може розглядатися поліетиленгліколь з молекулярною масою 1500 Да (ПЕГ-1500).

Мета нашої роботи – вивчення змін поверхневого маркера CD44 в еритроцитах, кріоконсервованих за наявності гліцерину та ПЕГ-1500 або при зберіганні в гіпотермічний умовах.

МЕТОДИКА

У роботі були використані такі реактиви: CD44-FITC (“BD Biosciences”, США), тріс, HEPES (“Sigma”, США), бичачий сироватковий альбумін (БСА; “PAA Laboratories GmbH”, Австрія), глюкоза та ПЕГ-1500 (“Fluka”, США), а також гліцерин і солі виробництва України та Росії (х.ч. або ч.д.а.). Препарат CD44-FITC являє собою моноклональні антитіла, кон'юговані з флуоресцентним барвником FITC, які специфічно зв'язуються з поверхневим мембранним маркером CD44.

Об'єктом дослідження були еритроцити крові донорів, заготовленої з використанням глюкозоцитратного розчину в центрі крові м. Харкова. Еритроцити осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв (ОПН-3) при кімнатній температурі, видаляли плазму і лейкоцитарні компоненти крові. Потім до осаджених еритроцитів додавали середовище А (ммоль/л): NaCl–150, тріс–HCl – 10; рН 7,4 в об'ємі, який в 5 разів перевищує об'єм клітинної маси і відмивали від залишків плазми і білих клітин триразовим центрифугуванням в аналогічному режимі.

Для кріоконсервування еритроцитів використовували кріозахисні розчини на основі гліцерину та ПЕГ-1500. Розчин, який містить 30% гліцерину, 4% манітолу, 0,7% NaCl, додавали в рівному об'ємі до еритроцитів, постійно перемішуючи, при кімнатній температурі. Кінцева концентрація гліцерину в суспензії становила 18–20%. Другий розчин – 30% ПЕГ-1500, на основі середовища А, додавали до охолоджених еритроцитів у рівному об'ємі при 5–7°C. Кінцева концентрація ПЕГ-1500 в суспензії становила близько 20%. Суспензії еритроцитів переносили в пробірки для заморожування й занурювали в рідкий азот (–196°C). Заморожені зразки відігрівали у водяній бані при 44°C.

Аліквоти клітин кожного зразка (близько 700 мкл) відбирали для аналізу змін стану поверхневого маркера еритроцитів CD44,

викликаних процесами заморожування–відтавання. Також клітини у розморожених зразках відмивали від кріопротекторів. Для гліцеринових зразків процедура відмивання включала осадження клітин центрифугуванням (3000 об/хв, 5–7 хв) і три етапи відмивання з використанням таких розчинів: 0,6 моль/л NaCl (перше відмивання) та 150 ммоль/л NaCl (друге і третє відмивання). Процедура відмивання зразків, кріоконсервованих з ПЕГ-1500, включала осадження клітин центрифугуванням (1500 об/хв, 5–7 хв) з подальшим розведенням осаджених клітин рівним об'ємом середовища А з аналогічним режимом центрифугування.

Надалі відібрані аліквоти клітин (50 мкл) суспендували в 500 мкл різних середовищ. Клітини, кріоконсервовані в гліцериновому середовищі, розводили в розчині 2 моль/л гліцерину, на основі середовища А. Клітини, кріоконсервовані під захистом ПЕГ-1500, розводили в 20%-му розчині цієї сполуки, на основі середовища А. Кріоконсервовані клітини, відмиті від кріопротекторів, розводили в модифікованому середовищі Рінгера, якій також використовували як контроль (ммоль/л): NaCl – 125, KCl – 5, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 1, HEPES – 32 (рН 7,4), глюкоза – 5 і БСА – 0,5%. Гематокрит клітинних суспензій становив близько 10%. Клітини інкубували протягом 1 год при 37°C. Потім клітинні суспензії розводили у відповідних розчинах до концентрації 10⁷ клітин/мл, додавали CD44-FITC та інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв у темряві. Після чого знижували концентрацію клітин до 10⁶ клітин/мл і оцінювали зв'язування еритроцитами CD44-FITC методом проточної цитометрії на приладі FACS Calibur (Becton Dickenson, США). У кожному вимірі прораховували 30000 подій. Результати аналізували за допомогою програми WinMDI 2.8.

Гемоліз визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм. За 100% приймали гемоліз у зразку, в якому еритроцити лізирували внесенням 0,01% розчину Тритону

X-100 в об'ємі у 1000 разів більшому, ніж об'єм еритромаси. Гемоліз оцінювали окремо після етапів розморожування та відмивання. У разі відмивки від гліцерину надосад усіх трьох етапів відмивання об'єднували і, таким чином, оцінювали рівень гемолізу, відповідний етапу відмивання. Розрахунок проводили з урахуванням об'ємів надосадів і коефіцієнтів розведення.

Статистичну обробку результатів виконували з використанням програмного пакета Statgraphics plus 2.1 for Windows і представляли у вигляді $M \pm SD$ (середнє значення \pm стандартне відхилення). Статистичну значимість відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою множинного рангового тесту Фішера за процедурою групування вибірок з найменш значимою різницею. У кожній серії проведено по шість дослідів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення показників маркера CD44 в еритроцитах базується на цитометричному аналізі гістограм розподілу клітин, мічених однойменним моноклональним антитілом, кон'югованим з флуоресцентним барвником FITC (CD44-FITC). Метод проточної цитометрії дає змогу охарактеризувати зміни субпопуляційного складу клітинної суспензії, яка представлена співвідношенням CD44⁺-клітин, в мембрані яких є молекули адгезії та CD44⁻-клітин, мембрани яких не містять молекул CD44. Крім того, важливою характеристикою CD44⁺-клітин є рівень експресії поверхневого маркера, тобто кількість або щільність молекул CD44 в мембранах клітин. Окремі клітини різняться за рівнем інтенсивності флуоресценції, що відображається на гістограмах розподілу цього показника. Зміна кількості молекул CD44 в мембранах CD44⁺-клітин (експресії маркера) під впливом певних факторів призводить до зміни діапазону інтенсивності флуоресценції, який охоплює зону CD44⁺-клітин. Адекватною характе-

ристикую, яка відображає зміну експресії маркера CD44 в клітинах, може бути медіана гістограми розподілу клітин, що показує величину, відносно якої клітини в суспензії розділені на дві рівні за чисельністю частини.

Перш за все, для аналізу змін маркера CD44 в клітинах під впливом різних режимів зберігання слід було чітко розмежувати зони двох вищевказаних субпопуляцій еритроцитів. У зв'язку з цим було оцінено розподіл нативних еритроцитів, які не інкубували з CD44-FITC, в межах FL1-каналу для того, щоб чітко ідентифікувати діапазон CD44-клітин (негативний контроль). Еритроцити, які не мічені моноклональними антитілами, розподілялися в діапазоні 0–3,5 ум.од. інтенсивності флуоресценції каналу FL1 (ІФ FL1; рисунок, а). У всіх наступних розрахунках верхнє значення цього діапазону було крайньою межею маркерів гістограм, відсікаючи частку CD44-клітин. У нативній суспензії близько 80% еритроцитів зв'язували мітку CD44-FITC, тобто були CD44⁺, і розподілялися в діапазоні від 3,5 до 100 ум.од. ІФ FL1 (див. рисунок, а) з середнім значенням медіани гістограм розподілу, представленим в табл. 1.

Зберігання еритроцитів в глюкозо-цитратному середовищі «Глюгіцер» у гіпотермічних умовах протягом 10 діб не впливало суттєво на характеристики поверхневого маркера CD44. У цьому разі ні кількість CD44⁺-клітин, ні експресія маркера в їх діапазоні не відрізнялися значимо від характеристик контрольних зразків (див. рисунок а, табл. 1).

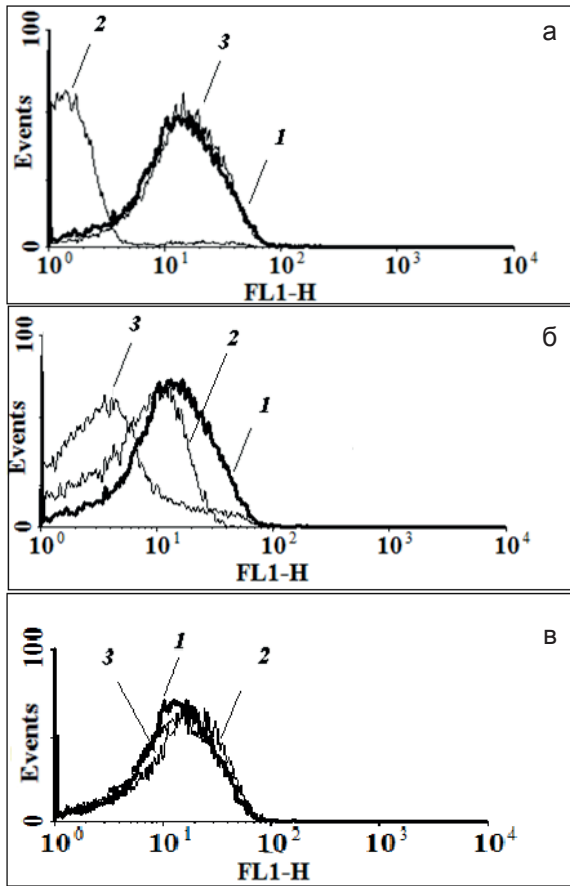
Зберігання еритроцитів при наднизьких температурах пов'язано з процесами заморожування-відтавання клітинних суспензій, які супроводжуються гемолізом унаслідок пошкоджень частини клітин (табл. 2), і, можливо, впливають на структурно-функціональні параметри інших клітин на рівні сублетальних або незначних для їх стабільності змін, які можуть відбитися на презентації поверхневих маркерів. Оцінка параметрів CD44 в розморожених еритроцитах, які зберегли цілісність і доступні для аналізу методом проточної цитометрії, була виконана після нетривалої їх експозиції при 37°C за наявності кріопротекторів. Значення медіан гістограм розподілу вказують на помітне зниження експресії поверхневого маркера CD44 (див. табл. 1, рисунок, б) у розморожених клітинах, яке було виражено однаково за наявності гліцерину і ПЕГ-1500. Разом з тим кількість CD44⁺-клітин у суспензії розморожених еритроцитів за наявності ендотеліального кріопротекторів змінювалася по-різному (див. табл. 1). У разі ПЕГ-1500 воно знижувалося більше, ніж у гліцерині. Більше того, кількість CD44⁺-клітин у розморожених суспензіях з ПЕГ-1500 вірогідно відрізнялася не тільки від контролю, але і від зразків розморожених еритроцитів, кріоконсервованих під захистом гліцерину.

Беручи до уваги, що при трансфузії кріоконсервованих еритроцитів передбачається попереднє видалення кріопротектора у разі використання гліцерину, або розведення кріопротектора у руслі крові з подальшим його

Таблиця 1. Вплив гіпотермічного зберігання і кріоконсервування в присутності гліцерину і ПЕГ-1500 на характеристики поверхневого мембранного маркера CD44 еритроцитів.

Схема досліджу	Кількість CD44 ⁺ - клітин, %	Медіана гістограми ІФ FL-1-канала, ум.од.
Контроль (середовище Рінгера)	79,9±3,6	13,3±1,3
Кріоконсервування за наявності гліцерину	69,5±1,7*	8,9±0,9*
ПЕГ-1500	57,8±8,0**	8,3±1,2*
Відмивання від гліцерину	81,7±3,2	14,3±5,3
ПЕГ –1500	81,9±6,1	12,8±2,6
Гіпотермічне зберігання	82,2±6,4	14,9±2,3

* P<0,05 відносно контролю, ** P <0,05 відносно зразків, заморожених під захистом гліцерину.



Вплив низькотемпературного і гіпотермічного зберігання на CD44 еритроцитів: а: 1 (тут і далі (б і в) – нативні еритроцити в середовищі Рінгера (контроль); 2 – еритроцити, що не мічені CD44-FITC (негативний контроль); 3 – еритроцити, що зберігалися в гіпотермічних умовах протягом 10 діб. б: еритроцити, кріоконсервовані під захистом гліцерину (2) і ПЕГ-1500 (3). в: еритроцити, відмиті від кріопротекторів, після кріоконсервування під захистом гліцерину (2) і ПЕГ-1500 (3). Параметри CD44 оцінювали після інкубування при 37 °С протягом 1 год за наявності кріопротекторів (б) або середовища Рінгера (а, в). За віссю абсцис – значення інтенсивності флуоресценції клітин в FL-1-каналі (ум.од. ІФ FL1); шкала представлена логарифмічними значеннями. За віссю ординат – кількість прорахованих подій в нормалізованому вигляді. Представлені результати типового експерименту

виведенням з організму при застосуванні ПЕГ-1500, доцільно було оцінити характеристики CD44 у суспензіях кріоконсервованих еритроцитів після відмивання кріопротекторів, моделюючи умови трансфузії. В процесі видалення кріопротекторів також спостерігався гемоліз (див. табл. 2), що могло стати причиною додаткових змін характеристик поверхневих маркерів в еритроцитарній суспензії. Було встановлено, що після видалення кріопротекторів і нестабільних клітин, які зазнали гемолізу в процесі відмивання, кількість CD44⁺-еритроцитів і рівень експресії маркера (див. рисунок, в) вірогідно не відрізнялися від контрольних значень (див. табл. 1). Ці факти вказують на те, що зниження презентації поверхневого маркера в кріоконсервованих клітинах може бути зумовлено популяцією нестабільних клітин з порушеною структурою, які видаляються в процесі відмивання (див. табл. 2).

Очевидно, що зміни поверхневого маркера CD44 в еритроцитах в процесі заморожування–відтавання пов’язані зі змінами фізико–хімічних показників середовища. У розморожених зразках, як було вище зазначено, зменшилася кількість CD44⁺-клітин, і знижувався рівень експресії цього маркера. Однак видалення кріопротекторів, яке супроводжується втратою частини клітин в процесі відмивання, відновлювало показники розподілу CD44 в суспензії кріоконсервованих еритроцитів до стану, порівнянного з контрольними характеристиками. Ці факти свідчать про те, що зміни охоплюють тільки частину клітин в суспензії і асоціюються з нестабільністю популяції еритроцитів із зміненими характеристиками CD44. Основні пошкодження субклітинних структур, зокре-

Таблиця 2. Гемолітичні ушкодження еритроцитів після розморожування і відмивання від кріопротекторів.

Схема досліджу	Гемоліз еритроцитів, %
Кріоконсервування за наявності гліцерину	5,2 ± 1,5
ПЕГ –1500	2,5 ± 1,6
Відмивання від гліцерину	18,2 ± 3,5
ПЕГ-1500	25,7 ± 3,7

ма мембран, у процесі заморожування–відтавання можуть бути пов’язані з процесами дегідратації макромолекул при зниженні температури нижче від 0°C або контактом клітинних компонентів з кристалами льоду, які утворюються в процесі заморожування або рекристалізації на етапі відтавання [14, 15]. Унаслідок цього відбуваються конформаційні порушення білків і зміни структурного порядку ліпідів у мембрані. Кріопротектори істотно згладжують несприятливі процеси і перешкоджають розвитку пошкодження клітин. Тим не менш у будь-якій системі існує неоднорідність фізико-хімічних показників середовища, яка пов’язана, зокрема, з різною віддаленістю клітин від стінок контейнерів, і, отже, від джерела холоду і тепла. Наявність теплового градієнта зумовлює ризик формування кристалів льоду в окремих ділянках системи та пошкодження частини клітин. Інший важливий фактор, який зумовлює можливість пошкодження частини клітин у суспензії, пов’язаний з віковою гетерогенністю еритроцитів. У зв’язку з тим, що старі еритроцити характеризуються меншою стійкістю до різних стресових впливів [16] можна очікувати, що вони будуть більше піддаватися руйнуванню в процесі кріоконсервування. Поєднання вищенаведених факторів зумовлює можливість пошкодження частини клітин в суспензіях, які кріоконсервуються. Такі пошкодження асоціюються з втратою інтегрального білка CD44 на стадії сублетальних порушень, коли клітини ще здатні зберігати цілісність, і можуть бути ідентифіковані методом проточної цитометрії. Видалення таких клітин у процесі відмивання призводить до відновлення характеристик CD44 в кріоконсервованих клітинних суспензіях, які успішно пережили стрес, пов’язаний із заморожуванням–відтаванням і видаленням кріопротектора.

Зниження експресії CD44 на поверхні еритроцитів може бути зумовлено везикуляцією мембрани. Серед факторів, що сприяють везикуляції, важливу роль може відігравати трансформація форми клітин [17]. Важливо

відзначити, що в суспензіях розморожених еритроцитів постійно спостерігаються трансформовані клітини. Відомо, що везикуляція мембран еритроцитів може відбуватися як в стресових [18], так і в фізіологічних умовах, зокрема, в процесі старіння *in vivo* [19]. Таким чином клітини позбавляються від ділянок мембрани, які несуть в собі специфічні ознаки старіння і можуть розпізнаватися імуннокомпетентними клітинами, що дає змогу їм безпечно залишатися довгий час у руслі крові [19]. Молекулярні механізми, які лежать в основі формування везикул та зміни показників поверхневого маркера CD44 в процесі кріоконсервування, можуть бути пов’язані зі структурними модифікаціями ліпідного бішару та/або змінами в системі білок-білкових взаємодій у мембрано-цитоскелетному комплексі. Зміни структури ліпідного бішару на окремих ділянках мембрани можуть індукувати процес формування везикул з включенням інтегральних білків, не пов’язаних з цитоскелетом, що призводить до зниження їх експресії на поверхні мембрани. Сприятливі втраті поверхневого маркера можуть також зміни зв’язків між мембранними білками і цитоскелетом еритроцитів під впливом факторів кріоконсервування. Відомо, що молекули CD44 пов’язані з білками цитоскелета. Ці зв’язки є динамічними і можуть відрізнятися в різних ділянках мембрани [3, 4]. В еритроцитах людини виявлена здатність CD44 взаємодіяти з цитоскелетом через анкірин і білок смуги 4.1 [20, 21]. Раніше було показано, що зміна білкових взаємодій у макромолекулярному комплексі до складу, якого входять білок смуги 4.1 та CD44 може впливати на експресію поверхневого маркера CD44, сприяючи її зниженню [21]. Якщо припустити, що під впливом факторів середовища в процесі кріоконсервування ослаблюються взаємодії в системі цього макрокомплексу білків, то втрата CD44 буде посилюватися. Важливо відзначити, що зміни вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} можуть відігравати ключову роль в ініціації таких процесів, оскільки

Ca²⁺ і кальмодулін знижують спорідненість взаємодії білка смуги 4.1 з CD44 [20]. Зміни вмісту внутрішньоклітинного Ca²⁺ [22, 23] та активності Ca²⁺-АТФази [24, 25], пов'язані із застосуванням гліцеролу і ПЕГ-1500 можуть сприяти цій тенденції.

При гіпотермічному зберіганні еритроцитів зміни структури плазматичної мембрани пов'язані з метаболічними порушеннями і окисними процесами, які торкаються ліпідних і білкових компонентів мембрани [18]. Оскільки зберігання еритроцитів за умов гіпотермії до 10 діб несуттєво впливало на характеристики CD44, можна зробити висновок, що цей період часу не є критичним для розвитку пошкоджень мембрани, які б позначалися на стабільності клітин, зокрема, не було виявлено сублетальних ушкоджень, пов'язаних з змінами характеристик CD44. Дійсно, під час проведення всіх етапів експерименту, пов'язаного з визначенням характеристик маркера CD44 в еритроцитах, які зберігалися в умовах гіпотермії, не було відзначено гемолізу еритроцитів. Порівнюючи результати впливу низькотемпературного та гіпотермічного зберігання еритроцитів на показники CD44, можна відзначити що, швидка втрата поверхневого маркера після кріоконсервування (протягом 1 год) може бути зумовлена структурними порушеннями мембрани під впливом фізико-хімічних факторів кріоконсервування, оскільки метаболічні ушкодження розвиваються досить повільно. В основі таких пошкоджень можуть лежати порушення зв'язків між білками макрокомплексів, які об'єднують цитоскелет і мембрану в єдину систему, і структурна модифікація ліпідів мембрани на окремих ділянках.

Отримані результати вказують на те, що оцінка гемолізу в суспензіях розморожених еритроцитів як основного тесту ефективності нових розроблених способів кріоконсервування, зокрема, з використанням ПЕГ-1500, без урахування змін поверхневих характеристик клітин, може призвести до завищення очікуваних показників життєздатності ери-

троцитів у руслі крові. Зміни характеристик поверхневого маркера CD44 в суспензії кріоконсервованих клітин, як відображення порушень білок-білкових і білок-ліпідних взаємодій у мембранах еритроцитів у процесі кріоконсервування, можуть також вказувати на зміну механо-еластичних властивостей мембрани, відповідальних за проходження еритроцитів через капілярну систему, і ризик розвитку внутрішньосудинного гемолізу. У перспективі, вивчення адгезивних властивостей кріоконсервованих еритроцитів, зумовлених наявністю в мембранах молекул адгезії CD44, дасть змогу охарактеризувати безпеку таких клітин для пацієнтів при трансфузії і знизити ризик вазооклюзивних процесів.

Таким чином, в еритроцитах, кріоконсервованих під захистом гліцерину і ПЕГ-1500, відзначається зниження кількості CD44⁺-клітин і рівня експресії поверхневого маркера. Використання ПЕГ-1500 призводить до більш вираженого зсуву характеристик CD44 у розморожених еритроцитах порівняно з гліцерином. Видалення кріопротекторів і втрата частини клітин у процесі відмивання призводять до відновлення характеристик CD44 в суспензіях кріоконсервованих еритроцитів. Отримані результати вказують на те, що під впливом заморожування-відтавання зміни торкаються тільки частини клітин, і асоціюються з нестабільністю популяції еритроцитів із зміненими характеристиками CD44, оскільки після видалення кріопротекторів із супутнім даній процедурі гемолізом, параметри CD44 в еритроцитарній суспензії відновлюються. На відміну від кріоконсервування гіпотермічне зберігання до 10 діб не впливало суттєво на характеристики CD44 еритроцитів.

Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук

ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО МАРКЕРА CD44 ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ

В работе исследованы изменения поверхностного маркера CD44 в эритроцитах, кріоконсервированных под защитой

глицерола и ПЭГ–1500 или хранившихся в гипотермических условиях. Показано, что при гипотермическом хранении характеристики CD44 в суспензии эритроцитов не менялись на протяжении 10 сут. В криоконсервированных эритроцитах отмечалось снижение количества CD44⁺-клеток и уровня экспрессии поверхностного маркера. Использование ПЭГ–1500 приводит к более выраженным изменениям характеристик CD44 в эритроцитах после размораживания в сравнении с глицеролом. Удаление криопротекторов и потеря части клеток в процессе отмывки вели к восстановлению характеристик CD44 в суспензии размороженных эритроцитов, которые успешно пережили стресс. Полученные результаты свидетельствуют, что в криоконсервированных эритроцитах выявленные изменения охватывают только часть клеток, и ассоциируются с нестабильностью популяции эритроцитов с измененными характеристиками CD44, поскольку после удаления криопротекторов с сопутствующим гемолизом нестабильных клеток, параметры CD44 в эритроцитарной суспензии восстанавливаются. Механизмы, лежащие в основе изменений параметров поверхностного маркера CD44 в размороженных эритроцитах, могут быть связаны с нарушением межмолекулярных взаимодействий в мембране под влиянием физико–химических факторов среды, и процессом везикуляции мембран с включением CD44 в состав везикул.

Ключевые слова: эритроцит; мембрана; CD44; замораживание; криопротектор; гипотермия.

N.G. Zemlianskykh, L.A. Babijchuk

CHANGES IN ERYTHROCYTE SURFACE MARKER CD44 DURING HYPOTHERMIC AND LOW TEMPERATURE STORAGE

We studied the changes in surface marker CD44 in erythrocytes, cryopreserved under the protection of glycerol and PEG–1500, or stored in hypothermic conditions. It was shown that during hypothermic storage the CD44 characteristics in erythrocyte suspension were unchanged within 10 days. In cryopreserved erythrocytes a reduction in CD44–positive cells and in the level of expression of the surface marker were marked. Using PEG–1500 resulted in more pronounced change in erythrocyte CD44 characteristics after freeze–thawing in comparison with glycerol. Removal of cryoprotectants and the loss of a part of cells during the washing process led to the restoration of the CD44 characteristics in freeze–thawed erythrocytes suspension which successfully survived after the stresses. The results indicate that revealed changes in cryopreserved erythrocytes cover only a part of the cells, and they are associated with the instability of the population of erythrocytes with altered CD44 characteristics wherethrough after the removal of cryoprotectants with concomitant hemolysis of unstable cells the CD44 parameters in erythrocyte suspensions recovered. The mechanisms underlying the changes in the parameters of the surface marker CD44 in freeze–thawed erythrocyte may

be related to the disruption of intermolecular interactions in the membrane under the influence of physical and chemical environmental factors, followed by the membrane vesiculation with the inclusion of the CD44 into the vesicles.

Key words: erythrocyte; membrane; CD44; freezing; cryoprotectant; hypothermia.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv.

REFERENCES

1. Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Haber T, Morgenstern A, Weiss A, Berman KC, Fibach E, Meyron–Holtz EerG. Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. *Haematologica*. 2012;97(7):994–1002.
2. Dinkla S, Novotný VM, Joosten I, Bosman GJ. Storage–induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies. *PLoS One*. 2012;7(8):1–9.
3. Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44 *Immunology*. 1998;93(2):139–148.
4. Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol*. 1997; 5(2): 57–71.
5. Telen MJ, Udani M, Washington MK, Levesque MC, Lloyd E, Rao N. A blood group–related polymorphism of CD44 abolishes a hyaluronan–binding consensus sequence without preventing hyaluronan binding. *J Biol Chem*. 1996;271(12):7147–53.
6. Xu Z, Duffett L, Tokessy M, Cote J, Goldman M, Saidenberg E. Anti–AnWj causing acute hemolytic transfusion reactions in a patient with aplastic anemia. *Transfusion*. 2012; 2(7):1476–81.
7. Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Semin Hematol*. 2000;37(2):130–142.
8. Hale LP, Singer KH, Haynes BF. CD44 antibody against In(Lu)–related p80, lymphocyte–homing receptor molecule inhibits the binding of human erythrocytes to T cells. *J Immunol*. 1989 143(12):3944–48.
9. Funaro A, Spagnoli GC, Momo M, Knapp W, Malavasi F. Stimulation of T cells via CD44 requires leukocyte–function–associated antigen interactions and interleukin–2 production. *Hum Immunol*. 1994;40(4):267–78.
10. van den Akker E, Satchwell TJ, Pellegrin S, Flatt JF, Maigre M, Daniels G, Delaunay J, Bruce LJ, Toye AM. Investigating the key membrane protein changes during in vitro erythropoiesis of protein 4.2(–) cells (mutations Chartres 1 and 2). *Haematologica*. 2010;95(8):1278–86.
11. Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, Truijens–de Lange R, Stekkinger PS, Bakker JC, Lagerberg JW, Brand A, Verhoeven AJ. Stability after thawing of RBCs frozen with the high– and low–glycerol method. *Transfusion*. 2003;43(2):157–64.
12. Stoll C, Holovati JL, Acker JP, Wolkers WF. Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch

- for cryopreservation of human erythrocytes. *Biotechnol Prog.* 2012;28(2):364–71.
13. Feuerecker M, Kaufmann I, Salam AP, Choukèr A. Effects of cryopreservation with polyethylene glycol on the expression of CD11b and CD62L on the surface of polymorphonuclear leukocytes. *Cryo Letters.* 2012;33(2):151–60.
 14. Gabellieri E, Strambini GB. ANS fluorescence detects widespread perturbations of protein tertiary structure in ice. *Biophys J.* 2006;90(9):3239–45.
 15. Wolkers WF, Balasubramanian SK, Ongstad EL, Zec HC, Bischof JC. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(3):728–36.
 16. Celedón G, González G, Barrientos D, Pino J, Venegas F, Lissi EA, Soto C, Martínez D, Alvarez C, Lanio ME. Stycholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* promotes higher hemolysis in aged red blood cells. *Toxicon.* 2008;51(8):1383–90.
 17. Iglic A, Veranic P, Jezernik K, Fosnaric M, Kamin B, Hägerstrand H, Kralj-Iglic V. Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes *Bioelectrochemistry.* 2004;62(2):159–61.
 18. Holovati JL, Wong KA, Webster JM, Acker JP. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. *Transfusion.* 2008;48(8):1658–68.
 19. Bosman GJ, Lasonder E, Groenen-Döpp YA, Willekens FL, Werre JM. The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J Proteomics.* 2012;76(Spec.):203–10.
 20. Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M, Mohandas N. Regulation of CD44 – protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44–ankyrin interaction. *J Biol Chem.* 1997;272(48):30322–8.
 21. Jeremy KP, Plummer ZE, Head DJ, Madgett TE, Sanders KL, Wallington A, Storry JR, Gilsanz F, Delaunay J, 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;94(10):1354–61.
 22. Kofanova OA, Zemlyanskikh NG, Ivanova L, Bernhardt I. Changes in the intracellular Ca²⁺ content in human red blood cells in the presence of glycerol. *Bioelectrochemistry.* 2008;73(2):151–4.
 23. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of Ca²⁺ influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG–1500) and sucrose media. *Ukr Biokhim Zh.* 2006;78(6):46–52. [Russian].
 24. Zemlyanskikh NG, Kofanova OA. Modulation of human erythrocyte Ca²⁺–ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. *Biochemistry (Moscow).* 2006;71(8):900–05.
 25. Zemlianskykh NG, Khomenko MV. Human erythrocyte Ca²⁺–ATPase activity in a hypertonic media at low and physiological temperature. *Biol Membrane.* 2006;23(№5):375–83. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 28.02.2015