

УДК 612.111:547.422:615.014.41

Н.Г. Землянских*, Л.А. Бабийчук

Влияние криоконсервирования в присутствии криопротектора ПЭГ-1500 на поверхностные характеристики эритроцитов

UDC 612.111:547.422:615.014.41

N.G. Zemlianskykh*, L.A. Babiychuk

Cryopreservation in Presence of PEG-1500 Affects Erythrocyte Surface Characteristics

Реферат: Исследования изменений поверхностных характеристик мембран эритроцитов, вызванных процессами замораживания-отогрева, могут быть важны для оценки структурно-функциональной полноценности клеток и понимания механизмов, ответственных за их повреждение в экстремальных условиях. В работе исследовали влияние криоконсервирования в присутствии экзоцеллюлярного криопротектора ПЭГ-1500 на асимметричное распределение фосфатидилсерина в мембране и характеристики поверхностного маркера CD44 в суспензии эритроцитов (количество CD44-позитивных клеток и уровень экспрессии). Было установлено, что после непродолжительного экспонирования размороженных эритроцитов при температуре 37°C количество клеток с нарушениями трансмембранной асимметрии фосфатидилсерина увеличивалось до 30%. Также в суспензии криоконсервированных эритроцитов отмечались уменьшение количества CD44-позитивных клеток и снижение уровня экспрессии маркера. Отмывка эритроцитов от криопротектора и гемолиз, сопровождающий данный процесс, приводили к восстановлению параметров CD44 в суспензии эритроцитов, сохранивших целостность. Обнаруженные нарушения поверхностных характеристик эритроцитов указывают на сублетальные повреждения мембран части клеток, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500. Это справедливо, по крайней мере, в отношении изменений поверхностного маркера CD44, поскольку после лизиса клеток с сублетальными повреждениями в процессе отмывки от криопротектора характеристики маркера в суспензии эритроцитов не отличались от контрольных значений.

Ключевые слова: эритроциты, мембрана, фосфатидилсерин, поверхностный мембранный маркер CD44, криоконсервирование.

Реферат: Дослідження змін поверхневих характеристик мембран еритроцитів, обумовлених процесами заморожування-відігріву, можуть бути важливі для оцінки структурно-функціональної повноцінності клітин і розуміння механізмів, відповідальних за їх пошкодження в екстремальних умовах. У роботі досліджували вплив криоконсервування в присутності екзоцелюлярного криопротектора ПЕГ-1500 на асиметричний розподіл фосфатидилсерину в мембрані та характеристики поверхневого маркера CD44 у суспензії еритроцитів (кількість CD44-позитивних клітин і рівень експресії). Було встановлено, що після нетривалого експонування розморожених еритроцитів за температури 37°C кількість клітин із порушеннями трансмембранної асиметрії фосфатидилсерину збільшувалася до 30%. Також у суспензії криоконсервованих еритроцитів відзначалися зменшення кількості CD44-позитивних клітин і зниження рівня експресії маркера. Відмивання еритроцитів від криопротектора і гемоліз, який супроводжував даний процес, приводили до відновлення параметрів CD44 у суспензії еритроцитів, що зберегли цілісність. Виявлені порушення поверхневих характеристик еритроцитів вказують на сублетальні пошкодження мембран частини клітин, криоконсервованих під захистом ПЕГ-1500. Це справедливо, принаймні, щодо змін поверхневого маркера CD44, оскільки після лізису клітин із сублетальними ушкодженнями у процесі відмивання від криопротектору характеристики маркера в суспензії еритроцитів не відрізнялися від контрольних значень.

Ключові слова: еритроцити, мембрана, фосфатидилсерин, поверхневий мембранный маркер CD44, криоконсервування.

Abstract: The studies of changes in surface characteristics of erythrocyte membranes caused by freeze-thawing can be important for assessment of structural and functional integrity of cells and understanding the mechanisms responsible for their damage under extreme conditions. In the research we studied the effect of cryopreservation in presence of exocellular cryoprotectant PEG-1500 on asymmetric distribution of phosphatidylserine in membrane and characteristics of the surface marker CD44 in erythrocyte suspension (the amount of CD44-positive cells and the expression level). It was found that cell amount with the impairments of transmembrane asymmetry of phosphatidylserine increased up to 30% after a short-term exposure of frozen-thawed erythrocytes at 37°C. The decrease in CD44-positive cell amount and lowering of the marker expression were also observed in cryopreserved erythrocyte suspension. Washing of erythrocytes from the cryoprotectant and hemolysis accompanying this process led to restoration of CD44 parameters in suspension of erythrocytes which preserved their integrity. The revealed impairments of surface characteristics of erythrocytes indicate a presence of sublethal membrane injuries in the cells cryopreserved under the protection of PEG-1500. This was true, at least in terms of the changes in the surface marker CD44 indices, since after lysis of cells compromised with sublethal injuries occurred during removal of cryoprotectant, the marker indices in erythrocyte suspension did not differ from the control values.

Key words: erythrocytes, membrane, phosphatidylserine, CD44, cryopreservation.

Отдел криоцитологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: nina_zemlya@mail.ru

Поступила 17.02.2015
Принята в печать 02.03.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 104–113.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: nina_zemlya@mail.ru

Received February, 17, 2015
Accepted March, 02, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(2): 104–113.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Криоконсервирование эритроцитов человека представляется весьма эффективным способом решения ряда проблем в практике гематологии и трансфузиологии. В частности, криоконсервированная кровь может быть востребована в кризисных условиях при массовых поражениях населения. Хранение крови при низких температурах в течение длительного времени без потери функциональной полноценности клеток позволяет также создавать запасы фенотипически редких эритроцитов. Это особенно актуально для пациентов с наследственными анемиями, которым регулярно проводят гемотрансфузии, в результате чего возникает риск развития иммуносенсибилизации к антигенам групп крови, для которых тестирование в обычной практике не проводится. Кроме того, аутотрансфузия криоконсервированной крови при хирургических вмешательствах может обеспечить более благоприятное протекание послеоперационного восстановительного периода.

В настоящее время разработаны различные способы криоконсервирования эритроцитов, отличающиеся конечной температурой хранения, скоростями замораживания и компонентами консервирующих растворов. Практически все они базируются на применении эндоцеллюлярного криопротектора глицерола. Он гарантирует высокую сохранность клеток в процессе криоконсервирования как при -80°C [14, 16], так и при более низких температурах (до -196°C) [16]. Однако использование эндоцеллюлярного криопротектора предполагает удаление данного химического соединения из клеток после размораживания, что требует дополнительных затрат. Перспективным направлением в решении данной проблемы может быть исследование различных экзоцеллюлярных соединений, которые позволили бы использовать криоконсервированные клетки без отмывания криопротекторов. Возможность применения таких эритроцитов для гемотрансфузии сразу после размораживания определяет важную роль поверхностных характеристик клеток для нормального функционирования в русле крови. В связи с этим исследования влияние криоконсервирования в присутствии экзоцеллюлярных криопротекторов на поверхностные характеристики эритроцитов могут быть важны для оценки структурно-функциональной полноценности клеток и понимания механизмов, ответственных за их повреждения в экстремальных условиях. Для эритроцитов человека перспективным экзоцеллюлярным криопротектором является полиэтиленгликоль с м. м. 1500 (ПЭГ-1500). Ранее было показано, что снижение температуры обработки эритроцитов данным криопротектором сопровождается

Cryopreservation of human erythrocytes is highly effective way to solve several challenges in hematology and blood transfusion practice. In particular, cryopreserved blood can be required in emergency situations related to the mass injury of the population. Blood storage at low temperatures for a long time without loss of functional value allows to create stocks of rare erythrocyte phenotypes. This is especially important for patients with hereditary anemia for whom regularly performed haemotransfusions result in an advancing risk of immune sensibilization to antigens, which are not tested in standard practice. Moreover, cryopreserved blood autotransfusion during surgical interventions may provide a more favorable course of post-surgery recovery period.

To the date there are various methods of erythrocytes cryopreservation, which differ on final storage temperature, freezing rates and components of preservative solutions. Almost all of them are based on the application of endocellular cryoprotectant glycerol. It ensures a high integrity of cells during cryopreservation both at -80°C [12, 14] and at lower temperatures (down to -196°C) [14]. However, the application of endocellular cryoprotectant involves the removal of the chemical compound from the cells after freeze-thawing that requires extra expenditures. Investigation of different exocellular compounds that would permit applying of cryopreserved cells without removing cryoprotectants may answer this challenge. The possibility of using these erythrocytes for transfusion immediately after freeze-thawing determines the important role of surface characteristics of cells for their normal functioning in blood stream. Herewith, the studies of cryopreservation effect in the presence of exocellular cryoprotectants on the surface characteristics of erythrocytes can be important for assessment of the structural and functional integrity of cells and the understanding of mechanisms responsible for their damage under extreme conditions. Polyethylene glycol with m. m. 1500 (PEG-1500) is perspective exocellular cryoprotectant for human erythrocytes. Previously it has been shown that decrease in temperature of erythrocyte treatment by this cryoprotectant is accompanied by a low haemolysis level after freeze-thawing [1]. However, transfer of cells to physiological conditions revealed their instability characterized by increased hemolysis in thawed suspension over time [19], that can be stipulated by lesions of structural and functional properties of membranes, including the alterations in their surface characteristics.

The research aim was to study the effect of cryopreservation using exocellular cryoprotectant polyethylene glycol with m. m.1500 on the surface

очень низким уровнем гемолиза на этапе размораживания [1]. Однако перенос клеток в физиологические условия выявляет их нестабильность, характеризуемую нарастанием гемолиза в суспензии с течением времени [2], что может быть обусловлено нарушениями структурно-функциональных свойств мембраны, в том числе, изменениями их поверхностных характеристик.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования с использованием экзоцеллюлярного криопротектора полиэтиленгликоля с м.м. 1500 на поверхностные свойства мембраны эритроцитов, в частности, на нарушение асимметричного распределения фосфатидилсерина в мембране и изменение характеристик поверхностного маркера CD44.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: CD44-FITC («BD Biosciences», США), Tris, HEPES («Sigma», США), бычий сывороточный альбумин (BSA; «PAA Laboratories GmbH», Австрия), глюкоза и полиэтиленгликоль м.м. 1500 (ПЭГ-1500; «Fluka», США), а также другие реактивы производства России и Украины («х.ч.» или «ч.д.а.»).

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

К эритроцитам добавляли раствор 30% ПЭГ-1500, 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,4 в равном объеме при температуре 5...7°C. Конечная концентрация ПЭГ-1500 в суспензии составляла около 20%. Затем эритроцитарные суспензии переносили в контейнеры для замораживания и погружали в жидкий азот (–196°C). Отогрев замороженных образцов проводили в водяной бане при 42°C до полного размораживания.

Экспонирование фосфатидилсерина на поверхности эритроцитов оценивали по связыванию аннексина V – FITC с клетками методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur («Becton Dickinson», США). Для этого 200 мкл криоконсервированных эритроцитов разводили до concentra-

properties of membrane of erythrocytes, in particular, an impairment of asymmetric distribution of phosphatidylserine in membrane and changes in surface marker CD44 indices.

Materials and methods

In this research there were used the following reagents: CD44-FITC (BD Biosciences, USA), Tris, HEPES (Sigma, USA), bovine serum albumin (BSA; PAA Laboratories GmbH, Austria), glucose and polyethylene glycol m. m.1500 (PEG-1500; Fluka, USA), as well as other reagents of Russian and Ukrainian production (chemically pure or pure for analysis).

Donor blood erythrocytes collected with glucose-citrate solution at Kharkiv Blood Center were the research object. Erythrocytes were pelleted (OPN-3 centrifuge) at 3000 rpm for 10 min at room temperature, plasma and leukocyte blood components were removed. Then sedimented erythrocytes were supplemented with a solution of 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 in a volume in 7–10 times higher than the one of cell mass and were washed from the residues of plasma and white blood cells by 3-fold centrifugation in a similar regimen.

Solution of 30% PEG-1500, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 of equal volume was added to erythrocytes at 5...7°C. The final PEG-1500 concentration in suspension was about 20%. Then the erythrocyte suspensions were transferred into containers for freezing and immersed into liquid nitrogen (–196°C). Frozen samples were being thawed in a water bath at 42°C until the full thawing of cell suspension.

Phosphatidylserine appearance on erythrocyte surface was assessed on the base of annexin V – FITC binding with cells by the instrumentality of flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA). To do this 200 µl of cryopreserved erythrocytes were diluted to the concentration of 10⁷ cells/ml in 20% solution of PEG-1500 prepared with annexin-binding buffer with the following incubating for an hour at 37°C. Annexin V – FITC binding reaction with the cells was later fixed.

To determine CD44 characteristics in cryopreserved erythrocytes the cell suspensions were diluted in corresponding solutions (20% solution of PEG-1500 or Ringer's solution) to concentration of 10⁷ cells/ml, and CD44-FITC was added with the following incubation at room temperature for 30 min in the dark. Then cell suspensions were diluted, reducing erythrocyte concentration to about 10⁶ cells/ml and the CD44-FITC binding with erythrocytes was assessed by flow cytometry. In each measurement of phosphatidylserine



ции 10^7 кл/мл в 20%-м растворе ПЭГ-1500, приготовленном на основе анексин-связывающего буфера, и инкубировали в течение часа при 37°C . Далее проводили реакцию по связыванию аннексина V – FITC с клетками.

Для определения характеристик CD44 в криоконсервированных эритроцитах клеточные суспензии разводили в соответствующих растворах (20%-м растворе ПЭГ-1500 или среде Рингера) до концентрации порядка 10^7 кл/мл и добавляли CD44-FITC с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. После чего клеточные суспензии разбавляли, снижая концентрацию эритроцитов до порядка 10^6 кл/мл, и оценивали связывание эритроцитами CD44-FITC методом проточной цитометрии. В каждом измерении асимметричного распределения фосфатидилсерина и характеристик CD44 просчитывали 30 000 событий.

Контролем во всех экспериментах служили нативные эритроциты, инкубированные в модифицированной среде Рингера: 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ CaCl_2 , 32 мМ HEPES (pH 7,4), 5 мМ глюкозы, 0,5% БСА.

Данные анализировали с помощью программы «WinMDI 2.8» (Scripps Research Institute). Результаты обрабатывали с использованием программы «Statgraphics plus 2.1 for Windows» («Statistical Graphics Corp.», США). Статистическую значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. В каждой серии проведено не менее пяти экспериментов.

Результаты и обсуждение

Известно, что фосфолипиды плазматической мембраны эритроцитов неравномерно распределены между наружным и внутренним монослоями липидного бислоя [6]. Большая часть фосфатидилхолина и сфингомиелина находится во внешнем монослое, а фосфатидилэтанолламин и фосфатидилсерин практически полностью сконцентрированы на цитоплазматической стороне мембраны. Асимметрия липидов контролируется двумя типами ферментов: флипазами (направлены на восстановление асимметрии и связаны с переносом молекул фосфатидилсерина во внутренний монослой мембраны) и скремблазами (направлены на разрушение асимметричного порядка липидов) [7]. Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} может стимулировать активность АТФ-независимого фермента скремблазы и запускать процесс скремблинга, в результате которого фосфатидилсерин экспонируется на поверхности клеток [13]. Цитометрический анализ нарушений асимметрии распределения

asymmetric distribution and CD44 characteristics 30,000 events were calculated.

Native erythrocytes incubated in Ringer's modified solution as: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 32 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM glucose, 0.5% BSA were the control in all the experiments.

The data were analyzed using WinMDI 2.8 software (Scripps Research Institute). The results were processed with Statgraphics plus 2.1 for Windows software (Statistical Graphics Corp.). A statistical significance of differences was assessed by Student's t-test. In each series at least five experiments were performed.

Results and discussion

It is known that erythrocyte plasma membrane phospholipids are unevenly distributed between the inner and outer monolayers of lipid bilayer [4]. Most of phosphatidylcholine and sphingomyelin are in outer monolayer while phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine are almost completely localized on cytoplasmic surface of membrane. Lipid asymmetry is controlled by two types of enzymes: flippases (targeted to restore asymmetry and associated with transfer of phosphatidylserine molecules to the inner monolayer of membrane) and scramblases (targeted to destroy asymmetric order of lipids) [5]. Increased level of intracellular Ca^{2+} can stimulate the activity of ATP-independent enzyme scramblase and initiate scrambling, that results in phosphatidylserine exposure on cell surface [11]. Cytometric analysis of impaired phosphatidylserine distribution asymmetry is based on a high affinity binding of externalized phosphatidylserine and annexin V, non-penetrating in cell protein, labeled with a fluorophore FITC. It was found that in erythrocyte membrane, cryopreserved under PEG-1500 protection, the amount of cells binding annexin V – FITC, could rise up to 30% (23.5 ± 5.4)% after an hour of frozen-thawed cells incubation at 37°C in the presence of cryoprotectant (Fig.1). Effect of cryoprotectant PEG-1500 on structure of lipid bilayer and changes in the behaviour of membrane transport systems caused by stress cryopreservation factors are probably the causes of transmembrane redistribution of phosphatidylserine. Particularly, development of these processes may be associated with increased level of cytosolic Ca^{2+} due to osmotic compression of the cells in the hypertonic cryoprotectant medium and inhibiting Ca^{2+} -ATPase activity [20, 21]. Phosphatidylserine redistribution leading to impairment of membrane lipid asymmetry in part of cryopreserved erythrocytes points to the possibility of forming the defects in plasma membrane. This is evidenced by a short period of time (1 h) after which the phosphatidylserine externali-

фосфатидилсерина основан на высокоаффинном связывании непроникающего в клетку белка аннексин V, меченного флуорофором FITC, с экстернализованным фосфатидилсерином. Было установлено, что в мембране эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500, количество клеток, связывающих аннексин V – FITC, может достигать 30% ($23,5 \pm 5,4\%$) после часа инкубирования размороженных клеток при температуре 37°C в присутствии криопротектора (рис. 1). Причинами трансмембранного перераспределения фосфатидилсерина, возможно, являются влияние криопротектора ПЭГ-1500 на структуру липидного бислоя и изменение состояния мембранных транспортных систем, вызванных стрессорными факторами криоконсервирования. В частности, развитие данных процессов может быть связано с повышением уровня цитозольного Ca^{2+} вследствие осмотического сжатия клеток в гипертонической криопротекторной среде и ингибирования активности Ca^{2+} -АТФазы [3, 21]. Перераспределение фосфатидилсерина, приводящее к нарушению асимметрии мембранных липидов у определенной части криоконсервированных эритроцитов, отражает возможность формирования дефектов в плазматической мембране. Об этом свидетельствует короткий промежуток времени (1 ч), в течение которого происходит экстернализация фосфатидилсерина в криоконсервированных эритроцитах, поскольку активация скремблазы в эритроцитах, нагруженных Ca^{2+} , при сохранении целостности мембраны приводит к подобным изменениям через более длительный интервал времени (3 ч) [4]. Предполагается, что дефекты упаковки мембранных липидов могут облегчать работу скремблазы [6, 7], что объясняет ускоренное проявление нарушений асимметричного распределения фосфатидилсерина в криоконсервированных эритроцитах. Необходимо также отметить, что экстернализация фосфатидилсерина во внешнем монослое мембраны служит сигналом для активации макрофагов с последующим удалением таких клеток из организма. Очевидно, что подобные нарушения могут негативно повлиять на криоконсервированные эритроциты в русле крови после трансфузии.

Процессы замораживания-отогрева могут оказать влияние на презентацию поверхностных мар-

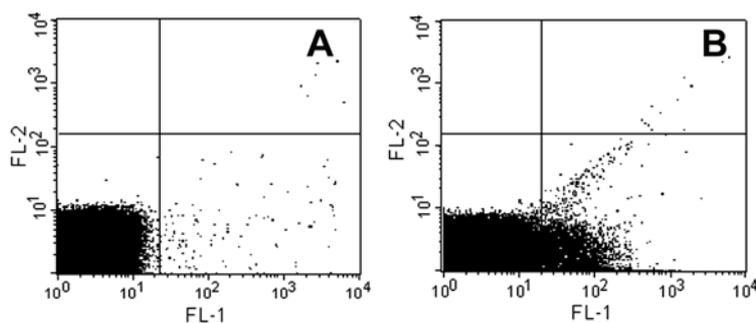


Рис. 1. Связывание аннексина V-FITC эритроцитами, криоконсервированными в присутствии ПЭГ-1500: **А** – среда Рингера (контроль); **В** – криоконсервирование под защитой ПЭГ-1500. Представлены точечные графики (*dot-plots*) типичного эксперимента: ось X – значения интенсивности флуоресценции клеток в канале FL-1 (усл. ед.), отражающие связывание клетками аннексина V – FITC; ось Y – интенсивность флуоресценции клеток в канале FL-2 (не содержит оцениваемых параметров). Шкала представлена логарифмическими значениями. Интенсивность флуоресценции оценивали после инкубирования при температуре 37°C в течение часа.

Fig. 1. Binding of annexin V – FITC with erythrocytes cryopreserved in the presence of PEG-1500: **A** – Ringer's medium (control); **B** – cryopreservation under protection of PEG-1500. Dot-plots of a typical experiment are presented: X axis – the values of fluorescence intensity of cells in FL-1 channel (arb. units), reflecting cell binding of annexin V – FITC; Y axis – intensity of cell fluorescence in FL-2 channel (does not contain estimated parameters). The scale is presented by logarithmic values. Fluorescence intensity was assessed after incubation at 37°C for an hour.

ization was observed in cryopreserved erythrocytes whereas the scramblase activation in Ca^{2+} loaded erythrocytes with preserved membrane integrity led to similar changes in a much longer period of time (3 h) [3]. It was assumed that disturbed packing of membrane lipids can enable the scramblase function [4, 5] that explained the rapid manifestation of impaired phosphatidylserine distribution asymmetry in cryopreserved erythrocytes. It is worth to mention that externalization of phosphatidylserine on the outer membrane monolayer serves as a signal for macrophage activation with the following removal of injured cells from an organism. It is obvious that such disorders may negatively affect cryopreserved erythrocytes in blood stream after transfusion.

Freezing and thawing can affect the presentation of erythrocyte surface markers. Surface marker CD44 is a transmembrane adhesion molecule mediating the binding of cells with extracellular matrix components [2, 15]. Several blood group antigens, belonging to two different systems such as In a/b (Lu) and AnWj were identified in erythrocyte CD44 structure [16, 20]. The CD44 marker may participate in cell-cell signaling and promote the activation of lymphocytes and monocytes



керов эритроцитов. Поверхностный маркер CD44 представляет собой трансмембранную молекулу адгезии, опосредующую связь клеток с компонентами внеклеточного матрикса [5, 17]. В структуре CD44 в эритроцитах идентифицированы несколько антигенов групп крови, принадлежащих к двум различным системам: In a/b (Lu) и AnWj [18, 20]. Маркер CD44 может участвовать в межклеточной сигнализации, способствуя активации лимфоцитов и моноцитов [8, 9], и выполнять определенные вспомогательные функции в иммунном ответе и воспалительных реакциях. Адгезивные свойства эритроцитов, опосредованные молекулами CD44, задействованы в патофизиологических процессах, связанных с вазоокклюзивными состояниями при серповидно-клеточной анемии и других заболеваниях [19]. Учитывая разнообразие функций CD44 в эритроцитах, изменения, затрагивающие данный маркер в процессе криоконсервирования, могут быть существенны для нормального функционирования клеток в русле крови.

Определение параметров маркера CD44 в эритроцитах основано на цитометрическом анализе гистограмм распределения клеток, меченных одноименным моноклональным антителом, конъюгированным с FITC (CD44-FITC). Проточная цитометрия позволяет охарактеризовать изменения субпопуляционного состава клеточной суспензии, представленного в данном случае соотношением CD44-позитивных клеток и CD44-негативных клеток. Важной характеристикой CD44-позитивных клеток является уровень экспрессии поверхностного маркера, т. е. количество или плотность молекул CD44 в мембранах CD44-позитивных клеток. Изменение количества молекул CD44 в мембранах клеток (экспрессии маркера) под влиянием воздействий приводит к изменению диапазона интенсивности флуоресценции, соответствующего зоне CD44-позитивных клеток. Адекватной характеристикой, отражающей изменение экспрессии маркера CD44 в клетках, является медиана гистограммы распределения клеток, показывающая величину, относительно которой клетки в суспензии разделены на две равные по численности части.

Результаты оценки состояния CD44 в размороженных эритроцитах, которые сохранили целостность и доступны для анализа методом проточной цитометрии, показали заметное снижение уровня экспрессии данного поверхностного маркера и количества CD44-позитивных клеток (рис. 2, таблица). Поскольку при трансфузии криоконсервированных эритроцитов происходит разведение и удаление криопротектора из русла крови, то целесообразно было также оценить характеристики

[6, 7] and perform certain secondary functions in immune response and inflammatory reactions. The adhesive properties of erythrocytes mediated by CD44 molecules are involved in pathophysiological processes associated with vasoocclusive states at sickle cell anemia and other diseases [17]. Taking into account the variety of CD44 functions in erythrocytes the changes affecting this marker during cryopreservation may be important for normal functioning of cells in blood stream.

Determination of CD44 marker indices in erythrocytes is based on cytometric assay of histograms of cell distribution, marked by the corresponding monoclonal antibody conjugated with FITC (CD44-FITC). Flow cytometry allows describing the changes in cell subpopulation composition of the suspension, represented in this case by the ratio of CD44-positive cells and CD44-negative cells. Surface marker expression level, *i. e.* the amount or density of CD44 molecules in membranes of CD44-positive cells is their important feature. Changing the amount of CD44 molecules in cell membranes (the marker's expression) caused by different impacts results in a changed fluorescence intensity range corresponding to the region of CD44-positive cells. Median of distribution histogram of cells demonstrating the value against which the cells in suspension are divided into two quantitatively equal parts, is an adequate characteristic, reflecting the change in expression of CD44 marker in cells.

Assessment of CD44 indices in frozen-thawed erythrocytes, which preserved the integrity and were available for flow cytometry analysis, showed an essential decrease in expression level of this surface marker and the amount of CD44-positive cells (Fig. 2, Table). Whereas the transfusion of cryopreserved erythrocytes results in dilution and removal of cryoprotectant from blood stream, it was reasonable to assess the characteristics of CD44 in suspension of cryopreserved erythrocytes after cryoprotectant washing. Removal of PEG-1500 cryoprotectant, accompanied by hemolysis (Table), and the following incubation of washed erythrocytes for an hour at 37°C in Ringer glucose medium resulted in recovery of the CD44 marker characteristics in the suspension of survived erythrocytes. The expression level of CD44 and the amount of CD44-positive erythrocytes in such cell suspensions (Fig. 2, Table) did not differ from the control values. The results obtained testify that decrease in the CD44 expression and the amount of CD44-positive erythrocytes in cryopreserved suspensions are referred to a cell population with injured membrane structure that lyse due to changing tonicity of medium during washing.

The mechanisms underlying the changes in expression of CD44 of cryopreserved erythrocytes could



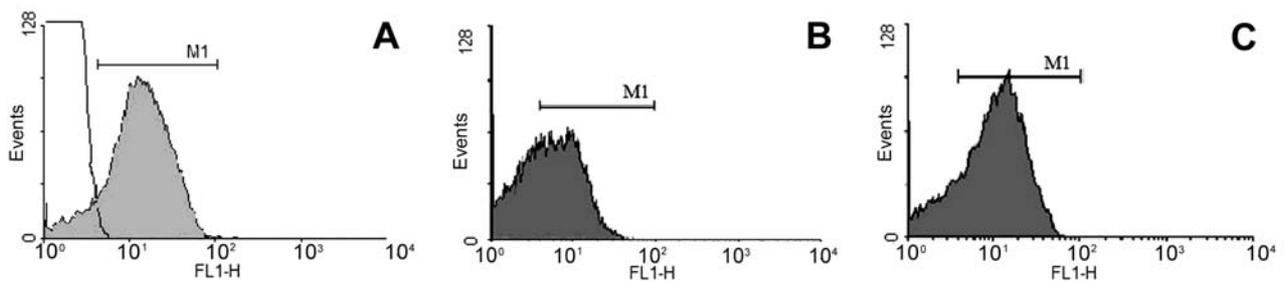


Рис. 2. Гистограммы распределения CD44-положительных эритроцитов: **A** – клетки в среде Рингера (контроль), контуром показана гистограмма эритроцитов, не меченных CD44-FITC (негативный контроль); **B** – после криоконсервирования под защитой ПЭГ-1500; **C** – после криоконсервирования под защитой ПЭГ-1500 и отмывки от криопротектора. Параметры CD44 оценивали после экспонирования эритроцитов при температуре 37°C в течение часа в среде с криопротектором (B) или среде Рингера (A, C). Ось X – значения интенсивности флуоресценции клеток в FL-1 канале (усл. ед.), шкала представлена логарифмическими значениями. Ось Y – количество просчитываемых событий. Данные представлены результатами типичного эксперимента.

Fig. 2. Histograms of distribution of CD44-positive erythrocytes: **A** – Ringer's medium (control), histogram of erythrocytes non-labeled with CD44-FITC (negative control) is outlined; **B** – following cryopreservation under protection of PEG-1500; **C** – following cryopreservation under protection of PEG-150 and washing from cryoprotectant. CD44 parameters were evaluated after exposure of erythrocytes at 37°C for an hour with cryoprotectant (B) or Ringer's medium (A, C). X axis represents the values of fluorescence intensity of cells in FL-1 channel (arb. units), the scale is presented by logarithmic values. Y axis reflects the number of calculated events. The data are the results of a typical experiment.

CD44 в суспензии криоконсервированных эритроцитов после отмывки криопротектора. Удаление криопротектора ПЭГ-1500, сопровождаемое гемолизом (таблица), и последующее инкубирование отмывших эритроцитов в течение часа при 37°C в Рингер-глюкозной среде приводили к восстановлению характеристик маркера CD44 в суспензии выживших эритроцитов. Уровень экспрессии CD44 и количество CD44-положительных эритроцитов в таких клеточных суспензиях (рис. 2, таблица), не отличались от контрольных значений. Данные результаты указывают на то, что снижение экспрессии CD44 и количества CD44-положительных эритроцитов в криоконсервированных суспензиях обусловлены популяцией клеток с нарушенной структурой, которые лизируют при изменении тоничности среды в процессе отмывки.

Механизмы, лежащие в основе изменений экспрессии CD44 в криоконсервированных эритроцитах, могут быть связаны с модификацией структурного порядка липидов мембраны и изменениями белок-белковых взаимодействий в мембраноцитоскелетном комплексе. Под влиянием криопротектора и других факторов криоконсервирования на отдельных участках мембраны могут возникать структурные изменения, способствующие фрагментации мембраны путем формирования везикул [10, 15], в состав которых могут включаться интегральные белки, в том числе маркер CD44. Стимулировать такие процессы может

be associated with a modification of the structure of membrane lipids and changes in protein-protein interactions in the membrane-cytoskeleton complex. Under the exposure of cryoprotectant and other cryopreservation factors, several areas of membrane could undergo the structural changes which in turn could promote membrane fragmentation by formation of vesicles [8, 13] including integral proteins, particularly, the CD44 molecule. Such processes could be stimulated by erythrocyte shape transformation related to emergence of areas with changed membrane curvature [9]. In addition, changes in links between membrane and cytoskeleton components also may contribute the vesicles formation. It has been known that CD44 molecules are bound to cytoskeleton protein network and the links vary in different regions of membrane. If an amount of CD44 molecules not linked to cytoskeleton increases, the possibility of their introduction into vesicles also rises. Protein 4.1 is the one of the possible region of rearrangements of protein-protein interactions in the membrane-cytoskeleton complex [10]. It is known that CD44 together with the other surface marker CD47 are involved in formation of macrocomplexes with the protein 4.1 mediating membrane-cytoskeleton interactions. Previously, it has been shown that erythrocytes of the patients with genetically determined absence of protein 4.1 also have the reduced amount of CD47 and CD44 [10]. Interestingly, these erythrocytes feature membrane structure regulation associated with the phosphatidylserine exposure on cell



трансформация формы эритроцитов, характеризующаяся появлением участков с измененной кривизной мембраны [11]. Кроме того, причиной, способствующей образованию везикул, может быть изменение связей между мембранными компонентами и цитоскелетом. Известно, что молекулы CD44 связаны с белками цитоскелетной сети и данные связи могут различаться в разных участках мембраны. В условиях, когда доля не связанных с цитоскелетом молекул CD44 увеличивается, возрастает и вероятность их включения в состав везикул. Одним из возможных участков перестроек белок-белковых взаимодействий в системе мембрано-цитоскелетного комплекса может быть белок полосы 4.1 [12]. Установлено, что CD44 вместе с другим поверхностным маркером CD47 включается в формирование макрокомплексов с участием белка полосы 4.1, который опосредует мембрано-цитоскелетные взаимодействия. Ранее было показано, что в эритроцитах пациентов с генетически обусловленным отсутствием белка полосы 4.1 происходит снижение содержания CD47 и CD44 [12]. Кроме того, в таких эритроцитах выявлена интересная особенность регуляции структуры мембраны, связанная с экспонированием фосфатидилсерина на поверхности клетки. Предполагается, что связь CD44 с белком полосы 4.1 может играть определенную роль в регуляторных сигнальных путях экспонирования фосфатидилсерина в мембране эритроцитов [12]. Проведя аналогию между описанной патологией и процессами, происходящими в эритроцитах в присутствии криопротектора, можно допустить, что под влиянием криоконсервирования происходит ослабление взаимодействий в системе данного макрокомплекса с участием белка полосы 4.1, что способствует потере маркера и, возможно, стимулирует сигнальные механизмы, ответственные за экспонирование фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны. Возможно, изменения, сопровождаемые экстернализацией фосфатидилсерина, способствуют разрушению части клеток со сниженным уровнем CD44 при стрессовых воздействиях, связанных с криоконсервированием.

Полученные результаты указывают на то, что обнаруженные нарушения поверхностных характеристик эритроцитов, криоконсервированных под

Гемолитические повреждения и характеристики поверхностного мембранного маркера CD44 эритроцитов после размораживания и отмытки от криопротектора

Hemolytic injuries and characteristics of the surface membrane marker CD44 of erythrocytes after freeze-thawing and washing from cryoprotectant

Воздействие Effect	Гемолиз эритроцитов, % Erythrocyte hemolysis, %	Количество CD44-позитивных клеток, % CD44 ⁺ cell content, %	Медиана гистограмм, усл. ед. ИФ канала FL-1 Histogramm median, arb. units of FL-1 channel IF
Контроль Control		79,3 ± 5,0	13,3 ± 1,3
Размораживание Freeze-thawing	2,5 ± 1,6	60,9 ± 3,3*	8,3 ± 1,2*
Замораживание-отогрев и отмытка от криопротектора Freeze-thawing and removal of cryoprotectant	25,7 ± 3,7	81,9 ± 6,1	12,8 ± 2,6

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$; данные представлены в виде $M \pm SD$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared with the control, $p \leq 0,05$; the data are presented as $M \pm SD$.

surface. It was assumed that link of CD44 with protein 4.1 can play a certain role in regulatory signaling pathways of phosphatidylserine exposure in erythrocyte membrane [10]. Comparing the described pathology and the processes occurring in cryopreserved erythrocytes in the cryoprotectant presence one can assume that cryopreservation may cause weakening of interactions in this macrocomplex with protein 4.1 and contribute to the loss of the marker as well as stimulate the signaling mechanisms responsible for phosphatidylserine exposure on outer surface of membrane. The changes accompanied by phosphatidylserine externalization possibly promote the destruction of the cells with reduced level of CD44 under stress associated with cryopreservation.

The results obtained indicate that revealed impairments of surface characteristics of erythrocytes cryopreserved under the PEG-1500 protection are associated with sublethal injuries of membranes. The estimation of hemolysis in erythrocyte suspensions cryopreserved in the presence of exocellular cryoprotectants used as the main test to assess effectiveness of the developed cryopreservation methods, could lead to the overestimation of the expected viability indices of erythrocytes in blood stream, if the tests would not be supplemented by the assessment of changes in surface cell characteristics. Assessment of the possible survival of erythrocyte cryopreserved under the PEG-1500 protection in blood stream should be primarily targeted to impairment of transmembrane phosphatidylserine asymmetry, which is a signal for

защитой ПЭГ-1500, связаны с сублетальными повреждениями мембран. Оценка гемолиза в суспензиях эритроцитов, криоконсервированных под защитой экзоцеллюлярного криопротектора, в качестве основного теста эффективности разрабатываемых способов криоконсервирования без учета изменений поверхностных характеристик клеток, может привести к завышению ожидаемых показателей жизнеспособности эритроцитов в русле клеток. Оценивая возможность выживания эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500, в русле крови, следует, прежде всего, обратить внимание на нарушение трансмембранной асимметрии фосфатидилсерина, который является сигналом активации макрофагов и элиминации клеток из русла крови. Кроме того, изменения характеристик поверхностного маркера CD44 в суспензии криоконсервированных клеток как отражение нарушений белок-белковых и белок-липидных взаимодействий в мембранах эритроцитов в процессе криоконсервирования, могут свидетельствовать и о нарушениях механо-эластических свойств мембраны, которые ответственны за прохождение эритроцитов через капиллярную систему, что может снижать их выживаемость в русле крови. В перспективе изучение адгезивных свойств криоконсервированных под защитой экзоцеллюлярных криопротекторов эритроцитов, обусловленных присутствием в мембранах молекул адгезии CD44, позволит охарактеризовать безопасность таких клеток для пациентов при трансфузии с целью предотвращения риска развития вазоокклюзивных процессов.

Выводы

В эритроцитах, криоконсервированных под защитой экзоцеллюлярного криопротектора ПЭГ-1500, отмечается нарушение асимметричного распределения фосфатидилсерина. Изменения охватывают примерно 30% клеток размороженных клеточных суспензий после часа экспонирования при физиологической температуре.

Количество CD44-позитивных эритроцитов и уровень экспрессии маркера снижаются в эритроцитах, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500. Отмывка эритроцитов от криопротектора и гемолиз, сопутствующий данному процессу, восстанавливают параметры CD44 в суспензии эритроцитов, сохранивших целостность.

Обнаруженные нарушения поверхностных характеристик эритроцитов указывают на сублетальные повреждения мембран части клеток, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500.

macrophage activation and following cell elimination. The changes in characteristics of the surface marker CD44 in suspension of cryopreserved cells as a reflection of disturbed protein-protein and protein-lipid interactions in erythrocyte membranes during cryopreservation also may testify to the alterations of mechanical and elastic properties of membrane, which are responsible for the passage of erythrocytes through a capillary system that may reduce their survival in blood stream. The further studies of adhesive properties of erythrocytes cryopreserved in the presence of exocellular cryoprotectants related to the membrane adhesion molecule CD44 would enable the characterizing of the safety of cryopreserved cells for the patients during transfusion to avoid the risk of vasoocclusive processes.

Conclusions

Erythrocytes cryopreserved with the exocellular cryoprotectant PEG-1500 had impaired asymmetry of phosphatidylserine distribution. The changes were observed in approx. 30% cells in frozen-thawed suspensions after an hour of their exposure at physiological temperature.

The amount of CD44-positive erythrocytes and expression level of the CD44 marker decreased in erythrocytes, cryopreserved under PEG-1500 protection. Washing of erythrocytes from cryoprotectant and hemolysis accompanying this process resulted in restoration of CD44 indices in suspension of erythrocytes preserved the integrity.

The observed disorders of erythrocyte surface characteristics indicate sublethal injuries of membranes of a part of cells cryopreserved under the PEG-1500 protection.

References

1. Belous A.M., Babiychuk L.A., Zemlianskykh N.G. Effect of dosage treatment by polyoxyethyleneoxide mol. m. 1500 to change in shape and permeability of erythrocyte plasma membrane. Doklady of the USSR Academy of Sciences 1989; 7: 59–63.
2. Borland G., Ross J.A., Guy K. Forms and functions of CD44. Immunology 1998; 93(2): 139–148.
3. Bratosin D., Estaquier J., Petit F. et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. Cell Death Differ 2001; 8(12):1143–1156.
4. Daleke D.L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. Curr. Opin. Hematol. 2008; 15(3): 191–195.
5. Devaux P.F., Lopez-Montero I., Bryde S. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. Chem Phys Lipids 2006; 141(1–2): 119–132.
6. Funaro A., Spagnoli G.C., Momo M. et al. Stimulation of T cells via CD44 requires leukocyte-function-associated antigen



Литература

1. Белоус А.М., Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Влияние дозированной обработки полиэтиленоксидом с мол. м. 1500 на изменение формы и проницаемости плазматической мембраны эритроцитов // Доклады АН УССР. – 1989. – №7. – С. 59–63.
2. Землянских Н.Г. О проблеме стабильности эритроцитов, консервированных под защитой полиэтиленгликоля // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – №3. – С. 32–37.
3. Землянских Н.Г., Хоменко М.В. Активность Ca^{2+} -АТФ-азы эритроцитов человека в гипертонических средах при низкой и физиологической температуре // Биол. мембраны. – 2006. – Т. 23, №5. – С. 375–383.
4. Bratosin D., Estaquier J., Petit F. et al. 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, №12. – P. 1143–1156.
5. Borland G., Ross J.A., Guy K. Forms and functions of CD44 // Immunology. – 1998. – Vol. 93, №2. – P. 139–148.
6. Dalek D.L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane // Curr. Opin. Hematol. – 2008. – Vol. 15, №3. – P. 191–195.
7. Devaux P.F., Lopez-Montero I., Bryde S. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells // Chem. Phys. Lipids. – 2006. – Vol. 141, №1–2. – P. 119–132.
8. Funaro A., Spagnoli G.C., Momo M. et al. Stimulation of T cells via CD44 requires leukocyte-function-associated antigen interactions and interleukin-2 production // Hum. Immunol. – 1994. – Vol. 40, №4. – P. 267–278.
9. Hale L.P., Singer K.H., 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, №12. – P. 3944–3948.
10. Holovati J.L., Wong K.A., Webster J.M., Acker J.P. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression // Transfusion. – 2008. – Vol. 48, №8. – P. 1658–1668.
11. Iglıc A., Veranic P., Jezernik K. et al. Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes // Bioelectrochemistry. – 2004 – Vol. 62, №2 – P. 159–161.
12. Jeremy K.P., Plummer Z.E., Head D.J. et al. 4.1R-deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins // Haematologica. – 2009. – Vol. 94, №10. – P. 1354–1361.
13. Lang F., Lang K.S., Wieder T. et al. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte // Pflugers Arch. – 2003. – Vol. 447, №2. – P. 121–125.
14. Lecak J., Scott K., Young C. et al. Evaluation of red blood cells stored at –80 degrees C in excess of 10 years // Transfusion. – 2004 – Vol. 44, №9. – P. 1306–1313.
15. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // Biophys. J. – 1995. – Vol. 68, №2. – P. 525–535.
16. Leikens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method // Transfusion. – 2003. – Vol. 43, №2. – P. 157–164.
17. Rudzki Z., Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells // Mol. Pathol. – 1997. – Vol. 50, №2. – P. 57–71.
18. Telen M.J. Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all // Blood. – 1995. – Vol. 85, №2. – P. 299–306.
19. Telen M.J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease // Semin. Hematol. – 2000. – Vol. 37, №2. – P. 130–142.
20. Xu Z., Duffett L., Tokessy M. et al. Anti-AnWj causing acute hemolytic transfusion reactions in a patient with aplastic anemia // Transfusion. – 2012. – Vol. 52, №7. – P. 1476–1481.
21. Zemlyanskikh N.G., Kofanova O.A. Modulation of human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin // Biochemistry (Mosc). – 2006. – Vol. 71, №8. – P. 900–905.
- interactions and interleukin-2 production. Hum Immunol 1994; 40(4): 267–278.
7. Hale L.P., Singer K.H., 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; 143(12): 3944–3948.
8. Holovati J.L., Wong K.A., Webster J.M., Acker J.P. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. Transfusion. 2008; 48(8): 1658–1668.
9. Iglıc A., Veranic P., Jezernik K. et al. Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes. Bioelectrochemistry 2004; 62(2): 159–161.
10. Jeremy K.P., Plummer Z.E., Head D.J. et al. 4.1R-deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins. Haematologica. 2009; 94(10): 1354–1361.
11. Lang F., Lang K.S., Wieder T. et al. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. Pflugers Arch. 2003; 447(2): 121–125.
12. Lecak J., Scott K., Young C. et al. Evaluation of red blood cells stored at –80 degrees C in excess of 10 years. Transfusion. 2004; 44(9): 1306–1313.
13. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes. Biophys. J. 1995; 68(2): 525–535.
14. Leikens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. Transfusion. 2003; 43(2): 157–164.
15. Rudzki Z., Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. Mol. Pathol. 1997; 50(2): 57–71.
16. Telen M.J. Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all. Blood. 1995; 85(2): 299–306.
17. Telen M.J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. Semin. Hematol. 2000; 37(2): 130–142.
18. Xu Z., Duffett L., Tokessy M. et al. Anti-AnWj causing acute hemolytic transfusion reactions in a patient with aplastic anemia. Transfusion. 2012; 52(7): 1476–1481.
19. Zemlyanskikh N.G. About the problem of erythrocyte stability, cryopreserved under polyethyleneglycol protection. Bulletin of the problems of biology and medicine. 2007; 3: 32–37.
20. Zemlyanskikh N.G., Khomenko M.V. Human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity in hypertonic media at low and physiological temperatures. Biol Membrany 2006; 23(5): 375–383.
21. Zemlyanskikh N.G., Kofanova O.A. Modulation of human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. Biochemistry (Moscow). 2006; 71(8): 900–905.

