

© В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко

УДК 547.422: 577.336

**В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко**

## РЕАКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОЛИМЕРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков)

Данная работа является фрагментом темы «Механизмы изменения осмотической и температурной чувствительности клеток при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, амфифильных веществ и криопротекторов» (№ госрегистрации 0104U006437).

**Вступление.** Белки мембран эритроцитов содержат SH-группы, состояние которых определяет функционирование ионных переносчиков [11], водного канала [12], агрегатное состояние спектрина [15] и взаимодействие цитоплазматического фрагмента белка полосы 3 с белками цитоскелета [4].

Обработка мембран эритроцитов ПХМБ приводит к нарушению связи мембрана-цитоскелет в области белок полосы 3-спектрина с последующей диссоциацией компонентов цитоскелета от мембраны [4, 6]. Действие данного сульфидрильного реагента проявляется при взаимодействии его со «скрытой» SH-группой, локализованной в гидрофобном фрагменте белка полосы 3 [10]. Эффективность проникновения ПХМБ в гидрофобные области мембраны обеспечивается предварительной обработкой мембран НЭМ, который блокирует 80% мембранных SH-групп, исключая SH-группы, локализованные во внутренних гидрофобных областях мембраны [5].

Обработка мембран эритроцитов селенитом натрия индуцирует конформационные изменения белков с ростом реакционной активности «скрытых» SH-групп, локализованных во внутренних гидрофобных доменах. Взаимодействие N-пиренмалеимида с данными SH-группами приводит к значительному усилению интенсивности флуоресценции пиренового хромофора метки в составе мембран [16], поэтому, исследуя реакционную активность «скрытых» SH-групп, можно оценивать структурное состояние мембран.

Повышение концентрации NaCl в среде замораживания с декстраном приводит к повышению степени повреждения эритроцитов после замораживания. При этом в среде с ПЭГ-1500 выявляется снижение степени повреждения клеток [3]. Это указывает на различие криопротекторных свойств декстрана и ПЭГ-1500, которое, возможно, определяется интенсивностью гиперконцентрирования NaCl при замораживании.

**Цель работы** – исследовать влияние декстрана, ПЭГ-1500 и высокой концентрации NaCl на взаимодействие сульфидрильного реагента N-пиренмалеимида с SH-группами мембран эритроцитов.

**Объект и методы исследования.** В работе использовали NaCl (х.ч.), сахарозу (х.ч.),

полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) производства Merck и декстран с молекулярной массой 35000 производства Serva. Использовали модификатор белка полосы 3 мембран эритроцитов ДИДС (4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфид) производства Serva, сульфидрильные реагенты: иодоацетамид (ИАА), N-этилмалеимид (НЭМ), N-пиренмалеимид производства Serva, параклормеркурийбензоат (ПХМБ) производства Sigma.

Эритроциты получали из крови II группы от доноров мужского пола четырехкратным отмыванием раствором, содержащим 0,9% NaCl.

Для модификации мембранного белка полосы 3 в суспензию эритроцитов с гематокритом 20% в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl и 10 ммоль/л трис (pH 7.4), был добавлен ДИДС в конечной концентрации 50 мкмоль/л. Суспензия эритроцитов инкубировалась при 37°C в течение 60 минут. Затем эритроциты отмывали средой инкубации, содержащей 0,5% альбумина, с последующим двукратным отмыванием той же средой с исключением альбумина. Подобная обработка клеток ДИДС приводит к ковалентному связыванию его с белком полосы 3 [7].

Для обработки сульфидрильными реагентами эритроциты с 20 %-м гематокритом суспендировали в среде, содержащей KCl – 90, NaCl – 45, сахарозу – 44, Трис – 10 ммоль/л (pH 7.4) [5]. ИАА (15 ммоль/л), НЭМ (10 ммоль/л), N-пиренмалеимид (100 мкмоль/л) или ПХМБ (1 ммоль/л) добавляли в суспензию клеток и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Обработку эритроцитов двумя реагентами ИАА и ПХМБ производили следующим образом. После инкубации суспензии эритроцитов в течение 20 мин с ИАА (15 ммоль/л) к ней добавляли ПХМБ (1ммоль/л) и инкубацию продолжали еще 60 минут. По истечении времени эритроциты отмывали 5 раз средой для обработки и до момента использования хранили на ледяной бане.

Взаимодействие N-пиренмалеимида с мембранами эритроцитов исследовали по нарастающую интенсивности флуоресценции реагента при температуре 16-18°C и длинах волн возбуждения и эмиссии 340 и 380 нм, соответственно. Пиреновый хромофор в составе N-пиренмалеимида начинает флуоресцировать после взаимодействия малеимидной группы данной метки с SH-группами [16]. Концентрация N-пиренмалеимида в реакционной среде составляла 5 мкмоль/л, концентрация белка мембран 80-100 мкг/мл.

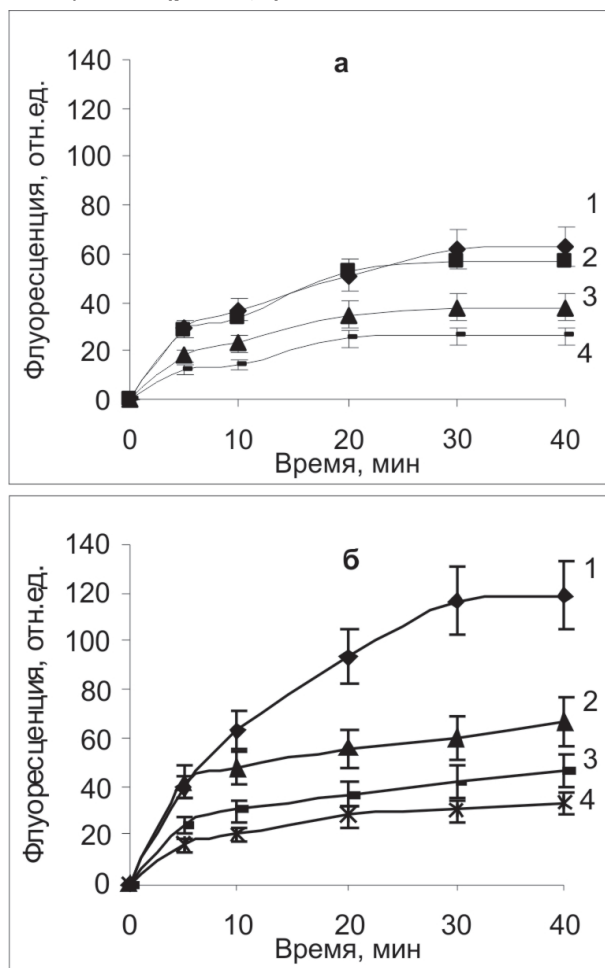
Получение мембран эритроцитов проводили по методике [7]. Содержание мембранного белка

определяли с помощью метода Лоури, модифицированного путем добавления дезоксихолата [8].

Статистические расчеты производили на основе результатов, полученных на эритроцитах от 5-ти доноров. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при  $p < 0,05$  [1].

## Результаты исследований и их обсуждение.

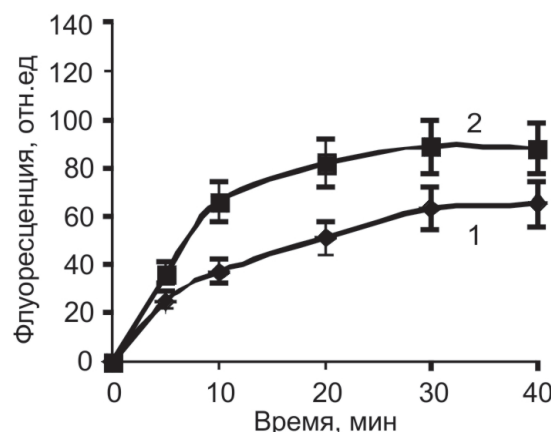
Исследование взаимодействия N-пиренмалеимида с мембранами эритроцитов показало, что присутствие в среде сахарозы не влияет на развитие флуоресценции, в то же время ПЭГ-1500 и декстран ингибируют эту реакцию (рис. 1,а). Наличие в среде 3 моль/л NaCl вызывает интенсификацию развития и рост уровня флуоресценции N-пиренмалеимида. Тем не менее, в этой среде полимерные криопротекторы усиливают свой блокирующий эффект. Кроме того, отмечается ингибирующее действие сахарозы на взаимодействие N-пиренмалеимида с мембранами (рис. 1,б).



**Рис. 1.** Развитие интенсивности флуоресценции N-пиренмалеимида в присутствии мембран эритроцитов в средах, содержащих 0,15 моль/л NaCl (а) или 3 моль/л NaCl (б). 2,3,4 – среды содержали дополнительно 15% сахарозы, декстрана и ПЭГ-1500, соответственно. Все среды содержали 10 ммоль/л трис (рН7,4).

Необходимо отметить, что в изотонической (рис. 1,а) и гипертонической (рис. 1,б) средах ингибиторный эффект ПЭГ-1500 и декстрана незначительно различается между собой. Однако не исключено, что в условиях замораживания эритроцитов при гиперконцентрировании среды эффекты ПЭГ-1500 и декстрана на гипертоническое воздействие могут различаться.

Модификация мембран эритроцитов ДИДС приводит к интенсификации развития и росту уровня флуоресценции при взаимодействии с N-пиренмалеимидом, по сравнению с контрольными мембранами (рис. 2). В связи с этим было показано, что присутствие в среде производных ДИДС усиливало ингибиторное действие ПХМБ на проницаемость мембран эритроцитов для воды. При этом ПХМБ связывался с SH-группой, локализованной в гидрофобном фрагменте белка полосы 3 [12]. Авторы предположили, что усиление ингибирования связано с изменением конформации белка полосы 3 при связывании модификаторов и с увеличением доступности SH-группы, реакция с которой вызывает ингибирование транспорта воды. Известно, что связывание ДИДС с белком полосы 3 приводит к изменению конформации белка и распаду его тетрамеров на димеры [13].



**Рис. 2.** Развитие интенсивности флуоресценции N-пиренмалеимида в присутствии мембран в среде, содержащей 0,15 моль/л NaCl, 10 ммоль/л трис (рН 7,4). Мембраны получены из контрольных (1) и обработанных ДИДС (2) эритроцитов.

Стимуляция реакции N-пиренмалеимида с мембранами при высокой концентрации NaCl (рис. 1) указывает на то, что, в данном случае, имеет место изменение конформации белка полосы 3 или распад его тетрамеров на димеры с соответствующим ростом реактивности «скрытых» SH-групп. В связи с этим можно предположить, что криопротекторы ослабляют гипертоническое действие и способствуют поддержанию нативной конформации белка полосы 3 и его тетрамерных форм.

Полученные результаты указывают на то, что в зависимости от условий среды N-пиренмалеимид может взаимодействовать не только с поверхностными мембранными SH-группами, но и со

«скрытыми», локализованными внутри мембраны. Для проверки этого предположения были проведены соответствующие эксперименты.

Мембраны, выделенные из эритроцитов, обработанных различными модификаторами и N-пиренмалеимидом, различаются по степени флуоресценции в них пиренового хромофора данной метки (рис. 3).

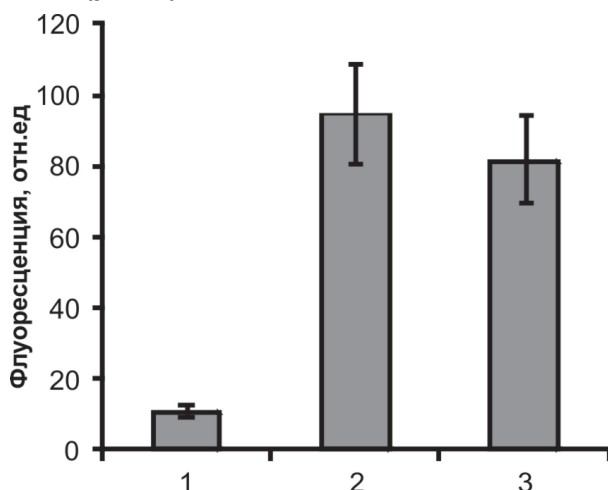


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции пиренового хромофора в составе мембран (80-100 мкг белка/мл), полученных из эритроцитов, обработанных: 1 – N-пиренмалеимидом, 2 – НЭМ+N-пиренмалеимид, 3 – ИАА+ПХМБ+N-пиренмалеимид.

При обработке эритроцитов одним N-пиренмалеимидом, соответствующие мембраны обладали относительно небольшим уровнем флуоресценции. Напротив, мембраны из эритроцитов, которые были предварительно обработаны НЭМ или ИАА+ПХМБ перед обработкой N-пиренмалеимидом, показывают высокий уровень флуоресценции (рис. 3).

Полученные результаты, вероятно, связаны с тем, что различия в интенсивности флуоресценции определяются не количеством SH-групп, которые прореагировали с N-пиренмалеимидом, а их локализацией в гидрофобном окружении внутри мембраны. В литературе имеются данные о том, что взаимодействие N-пиренмалеимида с SH-группами, локализованными в гидрофобных областях мембраны, по сравнению с SH-группами, экспонированными в водную среду, приводит к значительному росту интенсивности флуоресценции пиренового хромофора указанной метки [16]. Это связано с тем, что квантовый выход флуоресценции зондов определяется полярностью среды их окружения и возрастает при включении зондов в гидрофобную область мембран [2].

Было показано, что после блокирования НЭМ основной массы SH-групп, молекулы ПХМБ приобретают способность проникать в гидрофобные области мембраны и взаимодействовать с SH-группами, локализованными на гидрофобном сегменте белка полосы 3 [5]. Полученные результаты (рис. 3)

указывают на то, что обработка эритроцитов НЭМ или ИАА+ПХМБ способствует последующему включению флуоресцентной метки N-пирен-малеимид в гидрофобные области мембраны. Это предположение подтверждается следующими экспериментами.

На рис. 4, а показано «тушение» акриламидом флуоресценции пиренового хромофора в составе цистеила и мембран, полученных из эритроцитов различной модификации. N-пиренмалеимид-цистеил выявляет наибольшую доступность хромофора к «тушению» акриламидом. Меньшая доступность хромофора отмечается в мембранах из эритроцитов, обработанных только флуоресцентной меткой N-пиренмалеимидом.

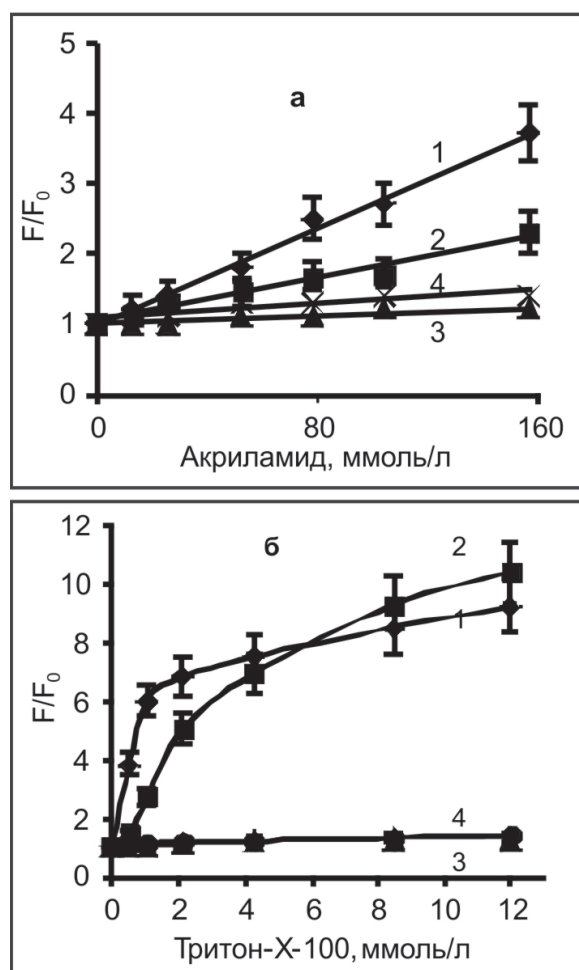


Рис. 4. «Тушение» акриламидом флуоресценции N-пиренмалеимидной метки в составе различных препаратов в координатах Штерна-Фольмера

(а) и рост интенсивности флуоресценции N-пиренмалеимидной метки при титровании тритоном-Х-100

(б). Препараты мембран получены из эритроцитов, обработанных: 2 – N-пиренмалеимидом, 3 – НЭМ + N-пиренмалеимид, 4 – ИАА + ПХМБ + N-пиренмалеимид. 1 – N-пиренмалеимид-цистеил.  $F_0, F$  – интенсивность флуоресценции препаратов в отсутствии и присутствии акриламида (или тритона-Х-100), соответственно.

В мембранах, полученных из эритроцитов с предварительной модификацией НЭМ или ИАА+ПХМБ, «тушение» хромофора практически не выявляется (рис. 4,а). Последние результаты указывают на внутримембранную локализацию метки N-пиренмалеимид, недоступную к «тушению» водорастворимыми молекулами акриламида. Титрование тритоном-X-100 тех же самых препаратов мембран показывает различную доступность хромофора для встраивания в детергентные мицеллы (рис. 4,б). N-пирен-малеимид-цистеил и мембраны, меченные N-пиренмалеимидом, выявляют значительный рост флуоресценции и, соответственно, высокую доступность пиренового хромофора метки для встраивания в гидрофобное ядро детергентных мицелл. При предварительной обработке эритроцитов НЭМ или ИАА+ПХМБ пиреновый хромофор практически недоступен к включению в мицеллы тритона-X-100 и поэтому не изменяется уровень флуоресценции (рис. 4,б). Эти результаты также подтверждают внутримембранную локализацию флуоресцентной метки N-пиренмалеимида и SH-групп, с которыми она прореагировала.

Блокирование SH-группы, локализованной на гидрофобном фрагменте белка полосы 3 ПХМБ приводит к нарушению взаимодействия мембраны с цитоскелетом [4, 6, 10]. Поэтому возникает вопрос, связывается ли N-пирен-малеимид с данной SH-группой. С этой целью исследовали гемолиз эритроцитов после обработки НЭМ под воздействием ПХМБ и N-пирен-малеимида.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие ПХМБ вызывает практически полный гемолиз НЭМ-модифицированных эритроцитов, тогда как действие N-пиренмалеимида приводит к существенно меньшему гемолизу (рис. 5). При обработке НЭМ-модифицированных эритроцитов N-пиренмалеимидом гемолитическое действие ПХМБ значительно ослабляется (рис. 5).

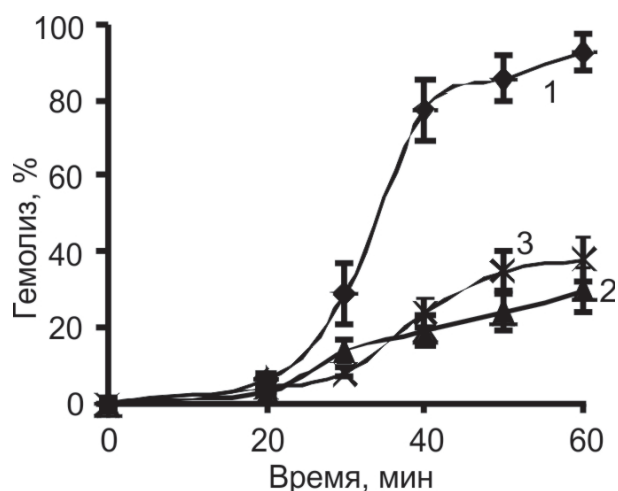


Рис. 5. Развитие гемолиза эритроцитов при инкубации с ПХМБ (1,3) (конц. 1 ммоль/л) или с N-пиренмалеимидом (2) (конц. 100 мкмоль/л), после предварительной обработки: 1,2 – НЭМ (конц. 10 ммоль/л); 3 – НЭМ + N-пиренмалеимид.

Полученные результаты указывают на то, что N-пиренмалеимид после обработки эритроцитов НЭМ взаимодействует с SH-группой на гидрофобном фрагменте белка полосы 3, при связывании с которой ПХМБ вызывает нарушение связей цитоскелета с мембраной.

Данные о реактивности SH-групп, ассоциированных с белком полосы 3, представлены в нескольких работах [5, 10, 14]. Установлено, что цитоплазматический фрагмент белка полосы 3 содержит пять SH-групп, которые могут блокироваться не только ПХМБ, но и НЭМ или ИАА [10]. Кроме того, существует шестая SH-группа, которая локализуется во внутримембранном гидрофобном фрагменте белка полосы 3. Указанная SH-группа недоступна для реакции с ИАА и НЭМ, но взаимодействует с ПХМБ и его производными [14]. Обработка эритроцитов ИАА ведет к его реакции с SH-группами цитоплазматических белков и с SH-группами мембран (до 50 %). В то же время, данный сульфгидрильный реагент не взаимодействует с SH-группами, локализованными в гидрофобных областях [5]. НЭМ реагирует с 80 % мембранных SH-групп, но не взаимодействует с SH-группами, локализованными в гидрофобных областях мембраны [5]. ПХМБ, являясь по своей природе гидрофобной заряженной молекулой, при действии на мембраны эритроцитов вызывает нарушение структурных взаимодействий мембранных белков [9]. Эффективность включения молекул ПХМБ в гидрофобную область и взаимодействие с SH-группой на гидрофобном фрагменте белка полосы 3 повышается после обработки мембран НЭМ [10]. Связывание ПХМБ с указанной SH-группой приводит к нарушению связи цитоскелета с мембраной [4, 6, 9]. Показано, что ПХМБ солибилизирует из мембран эритроцитов анкирин, белки полос 4.1 и 4.2, и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу, которые непосредственно ассоциированы с цитоплазматическим фрагментом белка полосы 3 [4]. После взаимодействия ПХМБ с SH-группой на гидрофобном фрагменте белка полосы 3 его интегральный домен изменяет свою конформацию, что отражается на взаимодействии цитоплазматического домена с белками цитоскелета, которые диссоциируют, а мембрана везикулирует [4, 6].

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что обработка эритроцитов НЭМ или ИАА+ПХМБ способствует взаимодействию N-пиренмалеимида с SH-группами, локализованными внутри мембраны на гидрофобном фрагменте белка полосы 3. Стимуляция взаимодействия N-пиренмалеимида с мембранами при высокой концентрации NaCl, или с мембранами, полученными из эритроцитов, обработанных ДИДС, определяется ростом реактивности SH-групп, локализованных на гидрофобном фрагменте белка полосы 3. Включение в среду с высокой концентрацией NaCl сахарозы и полимерных криопротекторов (декстран или ПЭГ-1500) ослабляет указанную стимуляцию реакции, вероятно, за счет стабилизации конформации белка полосы 3.



## Выводы.

1. Взаимодействие N-пиренмалеимида с мембранами эритроцитов значительно стимулируется высокой концентрацией NaCl (3 моль/л) и модификацией структурного состояния белка полосы 3 с ДИДС. Стимулирующий эффект высокой концентрации соли ослабляется при включении в среду сахарозы и полимерных криопротекторов (ПЭГ-1500 и декстрана).

2. Обработка эритроцитов НЭМ или ИАА+ПХМБ, с последующей обработкой N-пиренмалеимидом, по сравнению с эритроцитами, обработанными только N-пиренмалеимидом, приводит к: а) значительному росту интенсивности флуоресценции

метки N-пиренмалеимида в составе мембран; б) устранению способности акриламида «тушить» флуоресценцию пиренового хромофора метки в составе мембран; в) устранению включения пиренового хромофора метки в мицеллы тритон-Х-100.

3. Инкубация эритроцитов с ПХМБ после предварительной обработки НЭМ приводит к полному гемолизу клеток. Обработка эритроцитов N-пиренмалеимидом после НЭМ приводит к ингибированию гемолизирующего действия ПХМБ.

**Перспективы дальнейших исследований.** В следующей работе планируется исследовать влияния декстрана и ПЭГ-1500 на агрегатное состояние белка полосы 3 в мембранах эритроцитов.

## Список литературы

1. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И.П. Ашмарин, И.П. Васильев, В.А. Амбросов. – Л.: Из-во Ленингр. Ун-та. 1975. – 76 с.
2. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии / Д. Лакович. – М.: Мир. 1986. – 496 с.
3. Рамазанов В. В. Криопротекция полиэтиленгликолями и декстранами при замораживании эритроцитов с низким гематокритом / В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 217–228.
4. Clark S.J. The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate / S.J. Clark, G.B. Ralston // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – Vol. 1021. – P. 141–147.
5. Haest C.W.M. Topology of membrane sulfhydryl groups in the human erythrocyte. Demonstration of a non-reactive population in intrinsic proteins / C.W.M. Haest, D. Kamp, B. Deuticke // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 643. – P. 219–326.
6. Holdstock S.J. The solubilization of cytoskeletons of human erythrocyte membranes by p-mercuribenzenesulfonate / S.J. Holdstock, G.B. Ralston // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – Vol. 736. – P. 214–219.
7. Hsu L. The interaction of human erythrocyte band 3 with cytoskeletal components / L. Hsu, M. Morrison // Arc. Biochem. Biophys. – 1983. – Vol. 227, № 1. – P. 31–38.
8. Maddy A.H. Ox erythrocyte agglutinability. 1. Variation in the membrane protein / A.H. Maddy, R.L. Spooner // Vox Sang. – 1970. – Vol. 18, № 1. – P. 34–41.
9. Ralston G.B. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane / G.B. Ralston, E.A. Crisp // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 649. – P. 98–104.
10. Ramjeesingh M. The locations of the three cysteine residues in the primary structure of the intrinsic segments of band 3 proteins, and implications concerning the arrangement of band 3 protein in the bilayer / M. Ramjeesingh, A. Gaarn, A. Rothstein // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – Vol. 729. – P. 150–160.
11. Roy S.S. Role of sulfhydryl groups in band 3 in the inhibition of phosphate transport across erythrocyte membrane in visceral leishmaniasis / S.S. Roy, G. Sen, T. Biswas // Arch Biochem Biophys. – 2005. – Vol. 436, № 1. – P. 121–127.
12. Toon M.R. Control of red cell urea and water permeability by sulfhydryl reagents / M.R. Toon, A.K. Solomon // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol. 860. – P. 361–375.
13. Van Dort H.M. Effect of band 3 subunit equilibrium on the kinetics and affinity of ankyrin binding to erythrocyte membrane vesicles / H.M. Van Dort, R. Moriyama, P.S. Low // J Biol Chem. – 1998. – Vol. 273, № 24. – P. 14819–14826.
14. Werner P.K. Accessibility of the N-ethylmaleimide-unreactive sulfhydryl of human erythrocyte band 3 / P.K. Werner, D.M. Lieberman, R.A.F. Reithmeier // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol. 982. – P. 309–315.
15. Yang M. Effect of sulfhydryl reagents on spectrin states on the erythrocyte membrane / M. Yang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – Vol. 192, № 2. – P. 918–925.
16. Yang F.Y. Reaction of Se with SH groups in spectrin is involved in the stabilization of erythrocyte membrane skeleton / F.Y. Yang, M.Z. Yang // Biochem Int. – 1989. – Vol. 18. – P. 61085–61091.

УДК 547.422: 577.336

## РЕАКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОЛИМЕРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Рамазанов В.В., Воловельская Е.Л., Коптелов В.А., Бондаренко В.А.

**Резюме.** Исследовали влияние полиэтиленгликоля (ПЭГ-1500) и декстрана на реакционную активность флуоресцентной метки N-пиренмалеимида с мембранами эритроцитов. В среде с высокой концентрацией NaCl (3 моль/л) выявляется интенсификация взаимодействия N-пиренмалеимида с мембранами, которая ослабляется при включении в среду ПЭГ-1500 и декстрана. Кроме того, обработка эритроцитов модификатором белка полосы 3 ДИДС, также приводит к стимуляции взаимодействия N-пиренмалеимида с мембранами, полученными из модифицированных эритроцитов. Результаты позволяют предположить, что высокая концентрация электролита «разрыхляет» мембраны и усиливает реактивность SH-групп, локализованных в гидрофобных областях внутри мембраны, тогда как криопротекторы способствуют сохранению мембран в их изначальном структурном состоянии.

**Ключевые слова:** мембраны, сульфидрильные группы, криопротекторы.

УДК 547.422: 577.336

### **РЕАКЦІЙНА АКТИВНІСТЬ СУЛЬФІДРИЛЬНИХ ГРУП МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ПІД ВПЛИВОМ ПОЛІМЕРНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ**

**Рамазанов В.В., Воловельська Е.Л., Коптелов В.О., Бондаренко В.А.**

**Резюме.** Досліджували вплив поліетиленгліколя (ПЕГ-1500) і декстрана, що до реакційної активності флуоресцентної мітки N-пірен-малеїміду із мембранами еритроцитів. У середовищі з великою концентрацією NaCl (3 моль/л) визначається інтенсифікація взаємодії N-пі-ренмалеїміду із мембранами, яка послаблюється при включенні у середовище ПЕГ-1500 або декстрана. Крім того, обробка еритроцитів модифікатором білка смуги 3 ДІДС, також призводить до стимуляції взаємодії N-піренмалеїміду із мембранами, що отримували з модифікованих еритроцитів. Результати дозволяють припустити, що велика концентрація електроліту «разпушує» мембрани та посилює реактивність SH-груп, які локалізовані у гідрофобних областях всередині мембрани, тоді як кріопротектори сприяють збереженню мембран у їх початковому структурному стані.

**Ключові слова:** мембрани, сульфідрильні групи, кріопротектори.

UDC 547.422:577.336

### **Reactive Activity of Sulfhydryl Groups of Erythrocyte Membranes Under Effect of Polymeric Cryoprotectants**

**Ramazanov V.V., Volovelskaya Ye.L., Koptelov V.A., Bondarenko V.A.**

**Summary.** Effect of polyethyleneglycol (PEG- 1500) and dextran on reactive activity of fluorescent label N-pyrene maleimide with erythrocyte membranes were investigated. In the medium with high concentration of NaCl (3 M/l) there occur intensification of interaction of N-pyrene maleimide with membranes which is weakened during introduction in the medium PEG-1500 and dextran. Moreover treating of erythrocytes by band 3 protein modifier, DIDS also leads to the stimulation of interaction of N-pyrene maleimide with membranes obtained from modified erythrocytes. The results allow to suppose that a high concentration of electrolyte "looses" the membranes and strengthens the reactivity of SH-groups located in hydrophobic regions in the membrane while the cryoprotectants induce the membrane integrity in their initial structural state.

**Key words:** membranes, sulfhydryl groups, cryoprotectants.

Стаття надійшла 24.11.2011 р.