

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ Ca^{2+} -АТФазы ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЭГ-1500 И НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

© Н. Г. Землянских,* Л. А. Бабийчук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 61016, Украина;

** электронный адрес: nzemliansky@gmail.com*

В процессе криоконсервирования используют различные органические соединения, введение которых в клеточную суспензию вызывает модификацию субклеточных систем и обеспечивает выживание клеток в процессе замораживания—размораживания. Цель настоящей работы заключалась в определении модифицирующего влияния криопротектора ПЭГ-1500 и низких температур на активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, пермеабилizованных сапонином. Установлено, что ПЭГ-1500 ингибирует активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, несмотря на присутствие в среде эндогенных эффекторов, способных стимулировать функцию фермента. Модификация Ca^{2+} -АТФазы, по-видимому, обусловлена физико-химическими свойствами раствора данного полимера, поскольку удаление ПЭГ-1500 из среды ведет к восстановлению ее функциональной активности. Обратимость ингибирования Ca^{2+} -АТФазы характерна как для эритроцитов, экспонированных с криопротектором без замораживания, так и для тех, которые были заморожены и разморожены в присутствии ПЭГ-1500. Процессы замораживания—размораживания клеток без криопротектора не влияют на Ca^{2+} -АТФазу, что свидетельствует о криостабильности мембранной формы фермента. Несмотря на то что эффективность криоконсервирования эритроцитов под защитой ПЭГ-1500 зависит от температуры инкубирования на этапе, предшествующем замораживанию, функциональные показатели активности Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах в присутствии ПЭГ-1500 при 37 и 5—7 °С не имели значимых различий, если последующую реакцию гидролиза АТФ проводить при 37 °С. Но снижение температуры проведения ферментативной реакции до 5—7 °С после экспонирования эритроцитов с ПЭГ-1500 в аналогичных условиях дополнительно тормозит активность фермента. Выявленные изменения Ca^{2+} -АТФазной активности эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500 предположительно обусловлены модифицирующим влиянием криопротектора на структуру мембраны, в результате чего эндогенные эффекторы фермента, присутствующие в среде, не могут преодолеть ограничения, наложенные модифицированным мембранным окружением на функционирование фермента.

Ключевые слова: Ca^{2+} -АТФаза, мембрана, эритроциты, криопротектор, полиэтиленгликоль, замораживание.

Хранение объектов различного уровня организации является неотъемлемым этапом многих биомедицинских технологий. Благодаря подавлению биохимических реакций при низких (–130—–196 °С) температурах клетки не теряют своих структурных и функциональных свойств в течение долгого времени. Однако действие низких температур на биообъекты сопряжено с целым комплексом стрессовых факторов, включающих в себя образование кристаллов при переходе жидкой фазы в твердое состояние, рост концентрации солей и повышение осмотического давления в переохлажденной жидкости, дегидратацию макромолекул, а также фазовые переходы и латеральную сепарацию липидов мембран (Gao, Critser, 2000). Защиту клеток от неблагоприятных факторов криоконсервирования обеспечивают органические соединения, обладающие криопротекторными свойствами. Модификация отдельных клеточных органелл на этапе введения криопротектора в клеточную суспензию может влиять на устойчивость клеток в ходе замораживания—размораживания. Особая роль в регуляции стабильности клеток в стрессовых условиях принадлежит ионам Ca^{2+} (Bogdano-

va et al., 2013), повышение концентрации которых является триггером апоптоза (Lang et al., 2012).

Изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{in}$) в эритроцитах человека происходит двумя путями. Один из них обусловлен активацией специфических или неспецифических трансмембранных катионных каналов (Lang et al., 2007). Стимуляция входа Ca^{2+} in vitro может происходить даже в условиях, когда ионы не включены в состав среды в качестве специфического компонента, поскольку следовые количества Ca^{2+} , вплоть до концентрации 10^{-6} — 10^{-5} М, обнаруживаются в солевых растворах в качестве примесей (Patton et al., 2004). Вторым путем повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ зависит от модификации активности Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны, в связи с тем что эритроциты человека не содержат $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника и быстро мобилизуемых внутриклеточных резервов Ca^{2+} . Таким образом, $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ в эритроцитах человека зависит от баланса скоростей переноса Ca^{2+} через плазматическую мембрану: вход Ca^{2+} в клетку определяется концентрационным градиентом, а выход из клетки осуществляется единственной Ca^{2+} -транспортиру-

ющей системой — Ca^{2+} -АТФазой (Lew et al., 2003). Именно поэтому модификация активности Ca^{2+} -АТФазы под влиянием различных стрессорных факторов внешней среды играет ключевую роль в регуляции стабильности клеток.

Влияние органических соединений, многие из которых проявляют криопротекторные свойства, на активность Ca^{2+} -АТФазы были исследованы на различных биологических моделях. Стимуляция ферментативной активности изолированной Ca^{2+} -АТФазы, выделенной из мембран эритроцитов, была продемонстрирована в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ), диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина и этиленгликоля (Benaim, de Meis, 1989). Стимулирующий эффект связан с восстановлением гидрофобных взаимодействий мембранных доменов изолированного фермента под влиянием амфифильных веществ. Из-за отсутствия естественного липидного микроокружения активация фермента связана скорее с особенностями модельной системы, чем с влиянием данных веществ на Ca^{2+} -АТФазу в клетке.

Была выявлена возможность влияния ДМСО и глицерина на отдельные реакции каталитического цикла Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула (Martins, de Meis, 1985). В частности, для солубилизованного фермента было показано десятикратное превышение соотношения гидролиз/синтез АТФ, которое определяется изменениями активностей E_1 и E_2 фосфокоформеров Ca^{2+} -АТФазы, в сравнении с его мембранной формой. Органические соединения способствовали восстановлению этого соотношения до значений, близких параметрам ферментативной активности в составе мембран, что демонстрирует роль гидрофобного окружения, характерного для нативных мембран, в реализации отдельных реакций каталитического цикла Ca^{2+} -АТФазы. Кроме того, эти факты позволяют предполагать, что на различных экспериментальных моделях тенденции изменения активности Ca^{2+} -АТФазы под влиянием органического растворителя могут не совпадать. В частности, несмотря на усиление Ca^{2+} -АТФазной активности изолированного очищенного фермента в присутствии ДМСО (Benaim, de Meis, 1989), детальный анализ установил, что ДМСО не изменяет базовую активность Ca^{2+} -АТФазы в мембранной форме (белые тени эритроцитов) и ингибирует стимулируемую кальмодулином ферментативную активность (McConnell et al., 1999). Таким же образом различалось влияние глицерина на Ca^{2+} -АТФазу в замкнутых тенях и эритроцитах, пермеабелизованных сапонином (Землянских, Кофанова, 2006). Сравнительные исследования, выполненные на упомянутых выше экспериментальных моделях, выявили возможность вовлечения кальмодулина в регуляцию активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии глицерина.

Таким образом, влияние криопротекторов на Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов может быть вызвано действием органических соединений непосредственно на белковую макромолекулу или быть опосредованным структурной модификацией мембранных липидов и эндогенных модуляторов активности Ca^{2+} -АТФазы, обусловленных изменениями физико-химических параметров среды в присутствии криопротекторов. Влияние органических соединений на Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов может затрагивать различные стороны функциональной активности, и правильная оценка происходящих изменений в определенной степени зависит от адекватности экспериментальной модели.

Ранее на модели замкнутых теней эритроцитов, отмытых от компонентов цитоплазмы, было показано ингибирующее влияние ПЭГ-1500 на активность Ca^{2+} -АТФазы (Землянских, Хоменко, 2006). В настоящей работе для исследования действия ПЭГ-1500 на Ca^{2+} -АТФазную активность использовали пермеабелизованные детергентом эритроциты. Сохранение всех компонентов внутриклеточного содержимого эритроцитов при пермеабелизации плазматических мембран детергентами позволяет контролировать параметры среды ферментативной реакции и дает дополнительную возможность для определения модификации активности Ca^{2+} -АТФазы, которая может быть опосредована различными путями, в том числе эндогенными эффекторами (Покудин и др., 1988; Рыбина и др., 2001).

Защитное действие ПЭГ-1500 при криоконсервировании эритроцитов зависит от температуры, при которой клетки инкубируются с криопротектором на этапе, предшествующем замораживанию (Бабийчук, Землянских, 2001). Возможно, понижение температуры, затрагивающее скорость ферментативных реакций, является дополнительным условием модуляции активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, экспонируемых в ПЭГ-содержащей среде.

Цель настоящей работы заключалась в оценке модифицирующего влияния ПЭГ-1500 и низких температур на активность Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах человека с использованием модели пермеабелизованных детергентом клеток для определения активности фермента.

Материалы и методика

В работе использованы следующие реактивы: динатриевая соль АТФ, Трис, НЕРЕС и EGTA (Sigma, США); CaCl_2 , MgCl_2 и ПЭГ-1500 (Fluka, США); KCl , NaCl и другие реактивы производства России и Украины (х. ч. или ос. ч.).

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови, полученные из Центра крови (г. Харьков), со сроком хранения не более 4 сут при 3—5 °С. Эритроциты отмывали от плазмы и лейкоцитарных компонентов солевой средой А (150 мМ NaCl и 10 мМ Трис- HCl , pH 7.4), как описано ранее (Землянских, Кофанова, 2006).

К отмытым эритроцитам добавляли 30%-ный раствор ПЭГ-1500, приготовленный на основе среды А, в соотношении 1 : 1 (по объему) и инкубировали в течение 30 мин при 37 или 5—7 °С. Перед началом инкубирования температуру эритроцитарной суспензии и раствора криопротектора ПЭГ-1500 корректировали в соответствии с условиями эксперимента. Часть эритроцитов подвергали быстрому замораживанию, погружая контейнеры в жидкий азот (–196 °С). Размораживание образцов проводили в водяной бане при 37 °С. Контролем служили эритроциты, инкубированные в среде А при 37 °С в течение 30 мин.

При подготовке к проведению ферментативной реакции эритроциты, подвергнутые экспериментальному воздействию, осаждали центрифугированием (800 g) или отмывали от криопротектора добавлением 10-кратного объема среды А с последующим центрифугированием (1000 g). Определение активности Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах проводили, как описано ранее (Покудин и др., 1988; Рыбина и др., 2001; Землянских, Кофанова, 2006). Аликвоты эритроцитов вносили в среду В: 0.04 % сапонины, 135 мМ KCl , 10 мМ Трис, 10 мМ НЕРЕС (pH 7.4),

0.025 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 1 мМ EGTA и CaCl₂, который добавляли из расчета содержания свободного [Ca_i²⁺] на уровне (2—4) · 10⁻⁶ М или исключали из среды, что позволяло идентифицировать Ca²⁺-зависимую компоненту фосфатазной активности. При расчете концентрации свободного Ca²⁺ использовали программу MAXChelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). Конечная концентрация клеток в среде соответствовала 10%-ному гематокриту (примерно 10⁶ кл./мкл). Реакцию ферментативного гидролиза АТФ оценивали, инкубируя клетки в течение 20 мин при 37 °С или для части экспериментов при 5—7 °С. Останавливали реакцию холодным раствором трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5 %). Об изменении активности Ca²⁺-АТФазы судили по разнице накопления неорганического фосфора (P_i) в Ca²⁺-содержащей и Ca²⁺-несодержащей среде В. После остановки реакции белок осаждали центрифугированием при 800 g в течение 5 мин.

Определение P_i проводили по описанному методу (Rathbun, Betlach, 1969). Из супернатантов отбирали аликвоты объемом 100 мкл и добавляли к 2 мл ацетатного буфера (1.5 М CH₃COOH-CH₃COONa, pH 4.3), содержащего 3.7 % формальдегида и 10 % этанола. После этого к каждой пробе последовательно добавляли 0.1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и 0.2 мл 6.75 мМ хлорида олова. Пробы колориметрировали при длине волны 660 нм на спектрофотометре Ломо СФ-46 (Россия). Калибровочный график был линейным до 10 мкг неорганического фосфора в пробе.

При статистической обработке результатов использовали программный пакет Statgraphics plus 2.1. Данные представлены в виде среднего значения и его ошибки. Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера по процедуре группировки выборок с наименее значимой разницей. В каждой серии проведено не менее 8 экспериментов.

Результаты

Принимая во внимание тот факт, что ПЭГ-1500 не проникает в клетки и, следовательно, не контактирует с цитоплазматическими доменами Ca²⁺-АТФазы, его удаляли из клеточной суспензии до начала ферментативной реакции. С этой целью клетки после инкубирования с криопротектором осаждали и удаляли супернатант. При внесении аликвот осажденных клеток в среду ферментативной реакции, дополненную детергентом (среда В), происходит лизис эритроцитов, и образующиеся поры обеспечивают заданные параметры среды для ферментативного гидролиза АТФ (Покудин и др., 1988; Рыбина и др., 2001). Экспонирование эритроцитов с криопротектором при 37 или 5—7 °С приводит к значительному снижению активности Ca²⁺-АТФазы (рис. 1). Статистически значимых различий между Ca²⁺-зависимой компонентой фосфатазной активности в эритроцитах, инкубированных с ПЭГ-1500 при различных температурах, нет, если реакция гидролиза АТФ происходит при 37 °С (рис. 1, в, з). Полученные данные указывают на отсутствие специфических особенностей действия криопротектора на Ca²⁺-АТФазу в мембранах эритроцитов при исследованных температурах. Однако если после инкубирования эритроцитов с ПЭГ-1500 при 5—7 °С клеточную суспензию разделить на две части и оценить активность

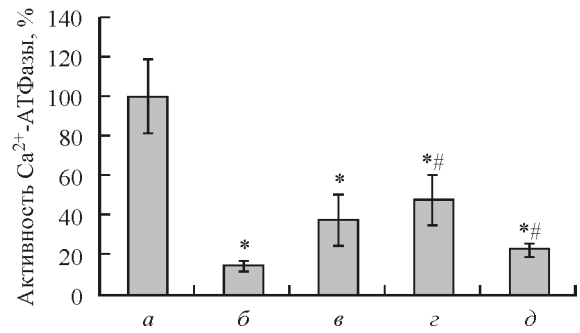


Рис. 1. Изменение активности Ca²⁺-АТФазы в эритроцитах человека под влиянием криопротектора ПЭГ—1500.

а, б — нативные эритроциты при 37 (контроль) и 5—7 °С соответственно; в, з — эритроциты, инкубированные в присутствии ПЭГ-1500 соответственно при 37 и 5—7 °С, с последующим проведением реакции гидролиза АТФ при 37 °С; д — эритроциты, инкубированные с ПЭГ-1500 при 5—7 °С, с последующим проведением реакции гидролиза АТФ при этой же температуре. Пермеабиллизация клеток сапонином для определения активности фермента проведена после описанных экспериментальных воздействий. Звездочка показывает достоверность различия относительно контроля (а) ($P < 0.05$); гидролиз АТФ при 37 °С, решетка — между отмеченными ею вариантами ($P < 0.05$).

Ca²⁺-АТФазы при разных температурах, то обнаруживается, что снижение температуры оказывает дополнительный ингибирующий эффект на Ca²⁺-АТФазу (рис. 1, д). В этих условиях активность фермента ниже в сравнении не только с контролем (рис. 1, а), но и с эритроцитами, инкубированными с ПЭГ-1500 при 5—7 °С, для которых последующая оценка функционирования Ca²⁺-АТФазы проводилась при 37 °С (рис. 1, з), что указывает на приоритетную роль термодинамических закономерностей в контроле ферментативных процессов в клетке.

Замораживание и размораживание эритроцитов под защитой ПЭГ-1500 (рис. 2, в, з) не вносит существенных изменений в режим работы Ca²⁺-АТФазы, который устанавливается на этапе экспонирования клеток с данным криопротектором. Сравнение ферментативной активности кальцийтранспортирующей системы эритроцитов, экспонированных в присутствии ПЭГ-1500 при различных температурах (рис. 1, в, з), с аналогичными вариантами после замораживания—размораживания клеток не выяв-

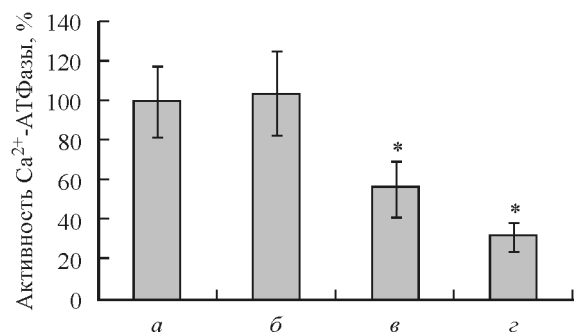


Рис. 2. Активность Ca²⁺-АТФазы в эритроцитах после криоконсервирования в присутствии ПЭГ-1500.

а — нативные эритроциты при 37 °С (контроль); б — эритроциты, замороженные до -196 °С без криопротектора; в, з — активность фермента в криоконсервированных эритроцитах, экспонированных предварительно с ПЭГ-1500 при 37 и 5—7 °С соответственно. Реакцию гидролиза АТФ проводили при 37 °С после размораживания образцов. Пермеабиллизация клеток сапонином для определения активности фермента проведена после размораживания. Звездочка показывает достоверность различий относительно контроля ($P < 0.05$).

ляет статистических различий. Не обнаруживается различий и между двумя группами размороженных эритроцитов, различавшихся начальными температурными режимами экспонирования клеток с криопротектором (рис. 2, в, з). Особого внимания заслуживает факт отсутствия влияния процессов замораживания и размораживания эритроцитов без защиты (без криопротектора) на активность Ca^{2+} -АТФазы в стационарных условиях проведения фосфатазной реакции, т. е. при высокой концентрации АТФ и оптимальном уровне свободного Ca^{2+} . Следовательно, основной причиной изменения активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов является модификация мембраны под влиянием физико-химических параметров среды в присутствии ПЭГ-1500, а не эффекты низкотемпературного консервирования.

Еще одна возможность, которую предоставляет модель-пермеабилizованных сапонином клеток, связана с оценкой обратимости изменений активности Ca^{2+} -АТФазы, вызванных присутствием ПЭГ-1500 в среде. Отмывка клеток от ПЭГ-1500 путем разбавления 10-кратными объемами среды А с последующим центрифугированием показала, что ингибирование Ca^{2+} -АТФазной активности является обратимым (рис. 3). В таком случае активность Ca^{2+} -АТФазы в двух экспериментальных группах эритроцитов, инкубированных при разных температурах с криопротектором (рис. 3, б, з), статистически не отличается от контрольных значений. Аналогичные результаты были получены и для криоконсервированных эритроцитов (рис. 3, в, д), несмотря на то что разбавление таких клеточных суспензий изотонической средой в процессе отмывки сопровождается гемолизом, т. е. потерей ~25 % клеток (Бабийчук, Землянских, 2001). Сравнение активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, экспонированных с ПЭГ-1500 (рис. 1, в, з) и криоконсервированных под защитой этого криопротектора (рис. 2, в, з), с соответствующими экспериментальными группами, в которых проводили отмывку от ПЭГ-1500, показывает, что значимые различия обнаруживаются для криоконсервированных клеток (рис. 3, в, д), но не для клеток, которые экспонировали с криопротектором без замораживания. Данные факты могут свидетельствовать о важной роли изменений субпопуляционного состава эритроцитарной суспензии в восстановлении показателей активности Ca^{2+} -АТФазы, обусловленных лизисом части размороженных клеток при отмывке от криопротектора.

Таким образом, ПЭГ-1500 вызывает торможение активности Ca^{2+} -АТФазы в пермеабилizованных сапонином эритроцитах, несмотря на присутствие эндогенных эффекторов, способных стимулировать функцию фермента. Влияние физико-химических параметров среды, обусловленных присутствием этого соединения, является определяющим фактором модификации активности Ca^{2+} -АТФазы, поскольку отмывка от криопротектора восстанавливает ее функциональные свойства. Это положение применимо как для эритроцитов, которые находились в присутствии криопротектора (без замораживания), так и для тех, которые были заморожены и разморожены в присутствии ПЭГ-1500. Процессы замораживания—размораживания клеток без криопротектора не влияют на Ca^{2+} -АТФазу, что свидетельствует о криостабильности фермента в мембранной системе. Экспонирование эритроцитов с ПЭГ-1500 при разных температурных режимах не выявило статистически значимых различий между активностями Ca^{2+} -АТФазы в условиях проведения ферментативной реакции при 37 °С, тогда

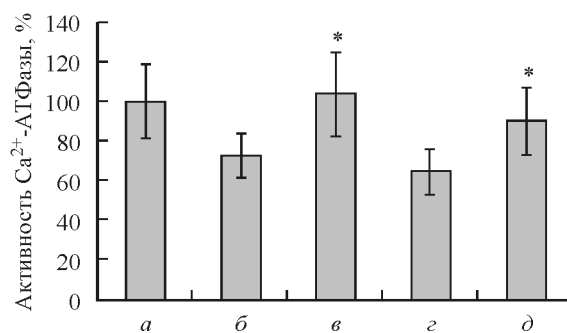


Рис. 3. Влияние удаления криопротектора ПЭГ-1500 на активность Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах: нативных при 37 °С (а, контроль), экспонированных без замораживания с ПЭГ-1500 при 5—7 (б) и (д) 37 °С, криоконсервированных после экспонирования с ПЭГ-1500 при 5—7 (в) и (з) 37 °С.

Пермеабилзация клеток сапонином для определения активности фермента выполнена после отмывки криопротектора из клеточных суспензий. Достоверных отличий от контроля нет; ср. с рис. 2, в, з: аналогичные варианты до отмывки от криопротектора отличаются от контроля.

как снижение температуры гидролиза АТФ до 5—7 °С вызывает дополнительное торможение ферментативной активности.

Обсуждение

Криоконсервирование клеточных суспензий предполагает использование криопротекторных веществ для защиты клеток от действия экстремальных факторов среды, характерных для процессов замораживания и размораживания. Сами криопротекторы независимо от действия низких температур оказывают существенное влияние на структурные и функциональные свойства различных клеточных структур даже в тех случаях, когда последние обладают выраженной криостабильностью. Вызванные криопротекторами изменения могут индуцировать определенную сбалансированность структурно-функционального состояния субклеточных систем, которая важна для выживания клеток в экстремальных условиях внешней среды. Изменения активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов являются важным элементом регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ и снижение ее функции в присутствии ПЭГ-1500 неизбежно повлечет за собой рост уровня Ca^{2+} , что может иметь определенные регуляторные последствия для клеток.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ингибирующее Ca^{2+} -АТФазу действие ПЭГ-1500 обусловлено его непосредственным присутствием в среде и не связано с какой-либо спецификой его взаимодействия с Ca^{2+} -АТФазой при различных температурах, поскольку уровни ее активности в эритроцитах, инкубированных с криопротектором при различных температурах, не имеют достоверных отличий от активности при нормотермических условиях (37 °С) проведения реакции гидролиза АТФ. Кроме того, не обнаруживается значимых различий и между активностью Ca^{2+} -АТФазы размороженных эритроцитов, экспонированных перед замораживанием с ПЭГ-1500 при 37 и 5—7 °С. Анализ результатов дает основание полагать, что Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов человека в составе мембранных структур является криоустойчивым ферментом, поскольку ни замораживание клеток без криопротектора, ни замораживание эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500 не вносит допол-

нительных изменений в ее работу в сравнении с уровнями ферментативной активности до замораживания—размораживания.

Аналогичные результаты были получены при изучении АТФазной активности везикул саркоплазматического ретикулума (Кузьмина, 1991), подвергнутых быстрому однократному замораживанию—размораживанию в жидком азоте. Однако необходимо заметить, что устойчивость Ca^{2+} -АТФазы к действию низких температур может не коррелировать с сохранностью ионтранспортирующей функции кальциевого насоса. Вопрос о влиянии процессов замораживания—размораживания на состояние систем, регулирующих уровень Ca^{2+} в клетках, является весьма непростым и к настоящему времени мало изучен.

Следует отметить некоторые особенности изменения активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов под влиянием ПЭГ-1500, выявленные после отмывки криопротектора в двух экспериментальных группах эритроцитов: 1) экспонированных с криопротектором без замораживания и 2) замороженных под защитой ПЭГ. Несмотря на то что отмывка ПЭГ-1500 восстанавливает функцию фермента, т. е. устраняет значимые отличия от контроля во всех экспериментальных группах, полноценное восстановление активности Ca^{2+} -АТФазы было только в случае криоконсервированных эритроцитов (рис. 3, в, д). Именно у таких эритроцитов функциональные показатели Ca^{2+} -АТФазы статистически отличались от показателей до отмывки криопротектора (рис. 2, в, г). Полученные факты, по-видимому, объясняются возрастной гетерогенностью эритроцитов и изменением субпопуляционного состава замороженных образцов вследствие разрушения некоторых клеток в процессе отмывки от криопротектора. Известно, что старые эритроциты имеют более высокий уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ и характеризуются более низкой активностью Ca^{2+} -АТФазы (Lew et al., 2007). Кроме того, в процессе старения эритроциты теряют сialовые кислоты (Jakubowska-Solarska, Solski, 2000), составляющие значительную часть клеточного гликокаликса, что меняет зарядовые характеристики мембраны и может создавать иные условия для взаимодействия клеток с ПЭГ-1500, чем в случае юных и зрелых клеток.

Ранее было показано (Землянских, Белоус, 1995), что радиоактивно меченные молекулы ПЭГ могут удерживаться на мембране после отмывки. Возможно, на мембранах старых клеток в составе клеточных суспензий, экспонированных с ПЭГ-1500, удерживается значительное количество полимера после отмывки криопротектора, что тормозит Ca^{2+} -АТФазу и снижает общий показатель активности фермента. Вместе с тем в клетках, замороженных и размороженных под защитой ПЭГ-1500, после отмывки криопротектора происходит гемолиз, и старые эритроциты, чувствительные к различным неблагоприятным воздействиям, очевидно, подвергаются разрушению в большей степени, чем все остальные клеточные субпопуляции (Celedón et al., 2008; Kucukatay et al., 2012). Удаление таких клеток из эритроцитарной суспензии, в которой определяется активность Ca^{2+} -АТФазы, объясняет ее более высокие значения.

Ингибирующее влияние ПЭГ-1500 на Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов обусловлено физико-химическими свойствами раствора данного полимера. Известно, что разные ПЭГ (с разной молекулярной массой) вызывают изменение поверхностного потенциала (Winterhalter et al., 1995) и диэлектрической проницаемости раствора (Arnold et al., 1985), образуют комплексы с ионами металлов или изме-

няют их активность (Bailey, Koleske, 1976; Chen et al., 2005). ПЭГ обладает амфифильными (гидрофильные и гидрофобные) свойствами и при комнатной температуре полностью растворяются не только в воде, но и в некоторых неполярных органических растворителях (Bailey, Koleske, 1976; Chen et al., 2005). В водных растворах ПЭГ связывает 2—3 молекулы воды на 1 мономерное звено (Bailey, Koleske, 1976). Способность полимера связывать воду обуславливает его дегидратирующее действие в отношении различных макромолекул и мембран клетки. Предполагается, что изменения полярности и гидратации при добавлении ПЭГ могут вносить существенный вклад в изменения поверхности мембраны в условиях мембранных контактов и слияния (Arnold et al., 1983). Добавление ПЭГ в раствор может быть и причиной снижения текучести мембран (Hertmann et al., 1983). Кроме того, молекулы ПЭГ способны распределяться на границе раздела фаз воздух—вода, образуя стабильные монослои (Kawaguchi et al., 1988; Sauer et al., 1989).

Эллипсометрические исследования границы раздела воздух—вода на монослоях ПЭГ показали, что полимер присутствует в узком слое (0.34—1 нм) вблизи границы раздела (Kawaguchi et al., 1988; Sauer et al., 1989) и исключается из интерфейса при достижении давления коллапса. Вместе с тем не существует четких представлений о конформации молекул ПЭГ на границах раздела воздух—вода или липид—вода и о влиянии полимеров на свойства липидных слоев. Тем не менее показано, что добавление ПЭГ изменяет поверхностный потенциал липидных монослоев (Bailey, Koleske, 1976) и вызывает сдвиг температуры фазового перехода липидов (Tilcock, Fisher, 1979), предположительно путем изменения сольватирующих свойств воды. Кроме того, установлено, что молекулы ПЭГ индуцируют сегрегацию мембранных липидов мультислойных везикул посредством дегидратации, которая сопровождается снижением эффективного размера полярных головных групп фосфолипидов, формирующих мембраны, и усилением ванн-дер-ваальсовых взаимодействий между ацильными цепями липидного матрикса (Lehtonen, Kinnunen, 1994, 1995). Такие структурные изменения обычно компенсируются увеличением толщины мембраны и уменьшением подвижности молекул липидов.

Изменения физико-химических свойств раствора могут затруднять конформационные превращения фермента в ходе каталитической реакции и снижать скорость работы Ca^{2+} -АТФазы посредством изменения свойств воды в мембранной области. Кроме того, торможение активности Ca^{2+} -АТФазы может быть следствием модификации липидных компонентов мембраны в присутствии ПЭГ-1500. В частности, увеличение толщины бислоя при дегидратации липидных молекул может вызывать определенные несоответствия в подгонке мембранных доменов Ca^{2+} -АТФазы по толщине липидного матрикса, что влечет за собой определенные ограничения в подвижности мембранных доменов, необходимых для реализации конформационных превращений Ca^{2+} -АТФазы (Lee, 2003).

Еще одна возможность торможения активности Ca^{2+} -АТФазы под влиянием ПЭГ-1500 посредством его дегидратирующего действия на липидный бислой может быть связана с влиянием на скорость обмена липидов, находящихся в аннулярном слое белковой молекулы, с липидами матрикса. Известно, что в аннулярном слое Ca^{2+} -АТФазы находится около 30 липидных молекул, а

время пребывания липидов в нем составляет менее 10^{-8} с (Lee, 2003). Изменяя подвижность молекул липидного матрикса, ПЭГ может влиять на липид-белковые взаимодействия, которые важны для структуры Ca^{2+} -АТФазы, а в результате и на активность фермента. По-видимому, структурные изменения мембраны эритроцитов, обусловленные криопротектором, являются достаточно сложными и устойчивыми, и даже присутствие в среде ферментативной реакции эндогенных модуляторов Ca^{2+} -АТФазы, способных оказывать стимулирующее действие, не может преодолеть ограничения, наложенные модифицированным мембранным окружением, на ее функционирование в мембранной системе. Хотя исследования изменений активности Ca^{2+} -АТФазы под влиянием глицерина показали возможность кальмодулинзависимой активации фермента в пермеабильзованных сапонином эритроцитов в отличие от экспериментальной модели изолированных мембран (Землянских, Кофанова, 2006).

Обнаруженные изменения Ca^{2+} -АТФазной активности в эритроцитах под влиянием ПЭГ-1500 не дают полного представления о механизме ее ингибирования и требуют дальнейшей оценки кинетических характеристик функционирования этой системы, ее чувствительности к регуляторным воздействиям Ca^{2+} в разных концентрациях, анализа Ca^{2+} -транспортирующей способности в условиях присутствия в среде ПЭГ-1500. Ответы на эти вопросы позволят в перспективе составить более четкие представления о состоянии и роли Ca^{2+} -регулирующих систем в изменениях структурно-функционального состояния клеток при использовании экзоцеллюлярных криопротекторов и действии низких температур.

Список литературы

Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г. 2001. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500. Проблемы криобиологии. 1 : 35—44. (Babijchuk L. A., Zemlyanskikh N. G. 2001. Optimization and advantages of washing-out method of erythrocyte cryopreservation with PEO—1500. Problems Cryobiology. 1 : 35—44.)

Землянских Н. Г., Белоус А. М. 1995. Взаимодействие ПЭО с плазматической мембраной эритроцитов после охлаждения и замораживания. Докл. НАН Украины. 3 : 119—121. (Zemlyanskikh N. G., Belous A. M. 1995. Interaction of polyethylene oxide with a RBC plasma membrane after cooling and freezing. Dokl. Nat. Acad. Sci. Ukraine. 3 : 119—121.)

Землянских Н. Г., Кофанова О. А. 2006. Модификация активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов человека под влиянием глицерола: роль кальмодулина. Биохимия. 71 (8) : 1112—1118. (Zemlyanskikh N. G., Kofanova O. A. 2006. Modulation of human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. Biochemistry (Moscow). 71 (8) : 900—905.)

Землянских Н. Г., Хоменко М. В. 2006. Активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов человека в гипертонических средах при низкой и физиологической температуре. Биол. мембр. 23 (6) : 484—492. (Zemlyanskikh N. G., Khomenko M. V. 2006. Human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity in hypertonic media at low and physiological temperatures. Biol. Membr. 23 (6) : 484—492.)

Кузьмина Л. Н. 1991. Влияние быстрого замораживания до -196°C на криочувствительность системы транспорта Ca^{2+} мембран саркоплазматического ретикулума мышц кролика в процессе развития. Проблемы криобиологии. 4 : 47—51. (Kuzmina L. N. 1991. Influence of fast freezing up to -196°C on cryosensitivity of Ca^{2+} transport system of sarcoplasmic reticulum membranes of rabbit muscle in under development process. Problems Cryobiology. 4 : 47—51.)

Покудин Н. И., Петруняк В. В., Орлов С. Н. 1988. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах in vivo? Биохимия. 53 (5) : 753—758. (Pokudin N. I., Petruniak V. V., Orlov S. N. 1988. Does calmodulin participate in the regulation of the Ca-pump of erythrocytes in vivo? Biochemistry (Moscow). 53 (5) : 753—758.)

Рыбина В. В., Еленская И. А., Каймачников Н. П. 2001. Регуляция активности Ca^{2+} -АТФазы ионами Ca^{2+} и кальмодулином в эритроцитах человека при различном времени хранения. Биол. мембр. 18 (4) : 287—293. (Rybina V. V., Elenskaya I. A., Kaimachnikov N. P. 2001. Regulation of Ca^{2+} -ATPase activity by Ca^{2+} and calmodulin in human erythrocyte at different storage times. Biol. Membr. 18 (4) : 287—293.)

Arnold K., Herrmann A., Pratsch L., Gawrisch K. 1985. The dielectric properties of aqueous solutions of poly(ethylene glycol) and their influence on membrane structure. Biochim. biophys. acta. 815 : 515—518.

Arnold K., Pratsch L., Gawrisch K. 1983. Effect of poly(ethylene glycol) on phospholipid hydration and polarity of the external phase. Biochim. biophys. acta. 728 : 121—128.

Bailey F. E., Koleske J. V. 1976. Poly(ethylene oxide). New York: Acad. Press. 173 p.

Benaim G., de Meis L. 1989. Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by organic solvents. FEBS Lett. 244 : 484—486.

Bogdanova A., Makhro A., Wang J., Lipp P., Kaestner L. 2013. Calcium in red blood cells—a perilous balance. Int. J. Mol. Sci. 14 : 9848—9872.

Celedón G., González G., Barrientos D., Pino J., Venegas F., Lissi E. A., Soto C., Martínez D., Alvarez C., Lanio M. E. 2008. Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* promotes higher hemolysis in aged red blood cells. Toxicol. 51 : 1383—1390.

Chen J., Spear S. K., Huddleston J. G., Rogers R. D. 2005. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. Green Chem. 7 : 64—82.

Gao D., Critser J. K. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. ILAR J. 41 : 187—196.

Herrmann A., Pratsch L., Arnold K., Lassmann G. 1983. Effect of poly(ethylene glycol) on the polarity of aqueous solutions and on the structure of vesicle membranes. Biochim. biophys. acta. 733 : 87—94.

Jakubowska-Solarska B., Solski J. 2000. Sialic acids of young and old red blood cells in healthy subjects. Med. Sci. Monit. 6 : 871—874.

Kawaguchi M., Tohyama M., Mutoh Y., Takahashi A. 1988. Ellipsometric study of polymer monolayers spread at the air/water interface. Langmuir. 4 : 407—410.

Kucukatay V., Bor-Kucukatay M., Gundogdu G., Erken G., Ozcan T. O., Miloglu F. D., Kadioglu Y. 2012. Vitamin E treatment enhances erythrocyte deformability in aged rats. Folia Biol. (Praha). 58 : 157—165.

Lang E., Qadri S. M., Lang F. 2012. Killing me softly — suicidal erythrocyte death. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44 : 1236—1243.

Lang F., Huber S.M., Szabo I., Gulbins E. 2007. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. Arch. Biochem. Biophys. 462 : 189—194.

Lee A. G. 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. Biochim. biophys. acta. 1612 : 1—40.

Lehtonen J. Y. A., Kinnunen P. K. J. 1994. Changes in the lipid dynamics of liposomal membranes induced by PEG. Biophys. J. 66 : 1981—1990.

Lehtonen J. Y., Kinnunen P. K. 1995. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes. Biophys. J. 68 : 525—535.

Lew V. L., Daw N., Perdomo D., Etzion Z., Bookchin R. M., Tiffert T. 2003. Distribution of plasma membrane Ca^{2+} pump activity in normal human red blood cells. Blood. 102 : 4206—4213.

Lew V. L., Daw N., Etzion Z., Tiffert T., Muoma A., Vanagas L., Bookchin R. M. 2007. Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. Blood. 110 : 1334—1342.

Martins O. B., de Meis L. 1985. Stability and partial reactions of soluble and membrane-bound sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 260 : 676—678.

McConnell E. J., Wagoner M. J., Keenan C. E., Raess B. U. 1999. Inhibition of calmodulin-stimulated ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase activity by dimethyl sulfoxide. *Biochem. Pharmacol.* 57 : 39—44.

Patton C., Thompson S., Epel D. 2004. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium.* 35 : 427—431.

Rathbun W., Betlach V. 1969. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 28 : 436—445.

Sauer B. B., Yu H., Kim M. W. 1989. An ellipsometric study of a diblock copolymer. *Langmuir.* 5 : 278—280.

Tilcock C. P. S., Fisher D. 1979. Interaction of phospholipid membranes with PEGs. *Biochim. biophys. acta.* 577 : 53—56.

Winterhalter M., Burner H., Marzinka S., Benz R., Kasianowicz J. J. 1995. Interaction of poly(ethylene-glycols) with air-water interfaces and lipid monolayers: investigations on surface pressure and surface potential. *Biophys. J.* 69 : 1372—1381.

Поступила 24 VI 2016

CHANGES IN ERYTHROCYTE Ca^{2+} -ATPASE ACTIVITY UNDER PEG-1500 AND LOW TEMPERATURE INFLUENCE

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

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov,

* e-mail: nzemliansky@gmail.com

During cryopreservation different organic compounds are applied. Their introduction into cell suspension causes modification of subcellular systems and provides cell survival during freeze—thawing. The aim of the study was to determine the modifying effect of cryoprotectant PEG-1500 and low temperatures on the Ca^{2+} -ATPase activity using the model of the saponin-permeabilized erythrocytes. PEG-1500 was found to cause the inhibition of erythrocytes Ca^{2+} -ATPase activity despite the presence in the medium of endogenous effectors capable of stimulating the enzyme function. Modification of Ca^{2+} -ATPase is apparently due to the physical and chemical parameters of the cryoprotectant solution since the removal of the polymer out of the medium leads to recovery of its functional properties. The reversibility of the inhibition of Ca^{2+} -ATPase is characteristic for erythrocytes exposed to the cryoprotectant without freezing as well as for those that have been frozen and thawed in the presence of PEG-1500. The processes of freezing—thawing of cells in the cryoprotectant-free medium did not affect the Ca^{2+} -ATPase activity indicating cryoresistance of the membrane-bound enzyme. Despite the fact that the efficiency of erythrocyte cryopreservation with PEG-1500 depends on incubation temperature prior to freezing, functional induces of Ca^{2+} -ATPase activity in the erythrocytes exposed to PEG-1500 at 37 of 5—7 °C show no significant differences when subsequent ATP hydrolyses reaction is carried out at 37 °C. However, reduction in the temperature upon enzymatic reaction progression down to 5—7 °C after treatment of erythrocytes with PEG-1500 under similar conditions, leads to additional inhibition of enzyme activity. The identified changes in Ca^{2+} -ATPase activity in the presence of PEG-1500 are presumably due to the modifying effect of cryoprotectant on the membrane structure and even presence of endogenous effectors in the medium cannot overcome the restrictions imposed by the modified membrane environment on this enzyme functioning.

Key words: Ca^{2+} -ATPase, membrane, erythrocyte, cryoprotectant, poly(ethylene glycol), freezing.