

Снижение активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов человека под влиянием ПЭО-1500

Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ, М.В. ХОМЕНКО, Л.А. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Изменение концентрации ионов Ca^{2+} в клетках в стрессовых условиях может иметь решающее значение для их выживания. Плазматические мембраны обеспечивают надежный барьер, позволяющий поддерживать 10000-кратный электрохимический градиент данного катиона. В эритроцитах человека огромные различия в концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и внеклеточной среде поддерживаются и контролируются единственным механизмом, осуществляющим его транспорт против градиента – Ca^{2+} -АТФазой плазматической мембраны [1]. Поэтому изменение функциональной активности этой транспортной системы эритроцитов при криоконсервировании может иметь особое значение в регуляции уровня Ca^{2+} , мессенджерные функции которого затрагивают практически все внутриклеточные системы и влияют на интегрированность метаболизма клетки в изменившихся внешних условиях.

В настоящее время в клинической практике многих стран широко используются криоконсервированные эритроциты [2]. Глицерол является наиболее часто применяемым криопротектором при длительном низкотемпературном хранении крови. Однако необходимость удаления глицерола из клеток перед трансфузией существенным образом усложняет технологию. Проблему создания безотмывочных способов криоконсервирования эритроцитов связывают с использованием непроникающих в клетки различных по природе химических соединений – экзоцеллюлярных криопротекторов. Одним из таких соединений является полиэтиленоксид с м.м. 1500 (ПЭО-1500). Замораживание эритроцитов в жидком азоте под защитой ПЭО-1500 позволяет сохранить их целостность на очень высоком уровне (гемолиз в жидкой фазе клеточной суспензии менее 2%). При этом было отмечено, что температура инкубирования эритроцитов с ПЭО-1500 (37 или 2-4 °С) может определенным образом повлиять на устойчивость клеток после цикла замораживания – отогрева [3].

Целью данной работы было исследование модификации активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов человека под влиянием экзоцеллюлярного криопротектора ПЭО-1500 в нормо- и гипо-

термических условиях, а также после их замораживания-отогрева и удаления ПЭО из среды.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: ATP-disodium, TRUZMA-BASE (Sigma), HEPES, EGTA, PMSF (Serva), KCl, MgCl_2 , CaCl_2 и другие реактивы производства Украины и России (х.ч. или о.с.ч.).

Эритроциты перед опытом осаждали путем центрифугирования при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-3), плазму и лейкоцитарный слой удаляли. Эритроциты промывали трижды 3-4-кратными объемами среды, содержащей 150 mM NaCl, 10 mM трис-HCl, pH 7.4.

Криобиологические процедуры. К эритроцитам добавляли 30%-ный раствор ПЭО-1500 на основе 150 mM NaCl, 10 mM трис-HCl, (pH 7,4) при 37°C и в гипотермических условиях (2-4°C). Замораживание проводили путем быстрого погружения контейнеров в жидкий азот, отогрев – при 42-44°C в водяной бане. Обратимость изменений в работе Ca^{2+} -АТФазы оценивали после разведения суспензии клеток в физиологическом растворе в соотношении 1:9. После чего клетки осаждали центрифугированием и использовали для определения ферментативной активности Ca^{2+} -насоса.

Оценку Ca^{2+} -АТФазной активности проводили, используя модель реконструированных клеток (правильно замкнутые тени) и сапонин-перфорированных эритроцитов.

Выделение мембран эритроцитов. Эритроциты лизировали 20-30 объемами гипотонической среды (5 mM KCl, 10 mM трис-HCl, pH 7.6) и выдерживали в течение 10 минут на ледяной бане. После чего тени осаждали центрифугированием при 20 тыс. g на рефрижераторной центрифуге (K-24, Германия) с последующим удалением надосадка. Процедуру отмывки мембран от внутриклеточных компонентов повторяли 3-4 раза в аналогичном режиме.

Замыкание белых теней проводили в растворе, идентичном реакционной среде, используемой для определения ферментативной активности Ca^{2+} -АТФазы [4]. Состав среды включал все компоненты, необходимые для ферментативной реакции: 135 mM KCl, 10 mM трис, 10 mM HEPES (pH 7,4), 0,037 mM MgCl_2 , 4 mM ATP, 1 mM EGTA, 1,5 mM PMSF и определенные концентрации CaCl_2 ,

Адрес для корреспонденции: Землянских Н.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

добавляемые в среду из расчета содержания свободного $[Ca_i]$ на уровне $(2-4) \times 10^{-6}$ М. При этом учитывали температурные изменения и наличие в среде Mg^{2+} и АТФ (software MAXChelator на сайте <http://www.stanford.edu/~spatton/maxc.html>). Перед началом этапа замыкания суспензию мембран делили на две равные части, которые инкубировали в течение 40 мин при $37^\circ C$ в замыкающих средах с включением необходимых концентраций $CaCl_2$ или без него (в присутствии только EGTA). По истечении периода инкубации тени снова осаждали при 20 тыс. g и удаляли надосадок. Реставрированные клетки промывали солевой средой А (135 mM KCl, 10 mM трис, 10 mM HEPES (pH 7,4), 0,037 mM $MgCl_2$) при соотношении объемов 1:4. С этой целью замкнутые тени осаждали еще раз центрифугированием при 20 тыс. g, а надосадок удаляли в равных пропорциях из Ca^{2+} -содержащей и Ca^{2+} -несодержащей проб. Непосредственно перед началом эксперимента из каждой пробы отбирали аликвоты теней для определения базового уровня фосфора (P_i) и концентрации белка. Базовый уровень P_i определяли после остановки АТФазной реакции в тенях непосредственно перед началом инкубации образцов в растворах ПЭО путем добавления холодной трихлоруксусной (ТХУ) кислоты до конечной концентрации 5%.

При оценке активности Ca^{2+} -АТФазы мембран эритроцитов человека в средах, с разными концентрациями ПЭО-1500 (2,5-30%), аликвоты замкнутых теней по 100 μ l добавляли к равным объемам растворов. Данные растворы, помимо заданных концентраций указанных выше осмолитов, также содержали в своем составе 150 mM KCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,4 (среда В). Замкнутые тени инкубировали в гипертонических средах в течение 20 мин. при 37 и $2^\circ C$. Об изменении активности Ca^{2+} -АТФазы под влиянием соответствующих температурно-осмотических условий судили по разнице накопления P_i в Ca^{2+} -содержащей и Ca^{2+} -несодержащей средах. При этом для каждой точки диапазона концентраций и температур содержание P_i оценивали в содержащих и несодержащих Ca^{2+} пробах после вычитания значений базового уровня P_i . Ферментативную реакцию останавливали добавлением холодной ТХУ до конечной концентрации 5%.

Определение активности Ca^{2+} -АТФазы в сапонин-перфорированных эритроцитах проводили как описано в работе [4]. Перед экспериментом клетки, инкубированные с ПЭО-1500, а также после замораживания осаждали. Аликвоты после удаления ПЭО из надосадка использовали для определения Ca^{2+} -АТФазной активности. Эритроциты вносили в среду, анало-

гичную используемой для реконструированных клеток и описанную выше. Реакцию ферментативного гидролиза АТФ отслеживали, инкубируя клетки при $37^\circ C$ в течение 20 минут. После чего реакцию останавливали, добавляя холодный раствор ТХУ.

Определение P_i проводили по методу [5].

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [6].

Результаты статистически обработаны с использованием программы Statgraphics plus 2.1 for Windows. Результаты представлены в виде Mean \pm SEM.

Результаты и обсуждение

При исследовании активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в условиях введения в клеточную суспензию криопротектора ПЭО-1500 следует принять во внимание ряд важных аспектов механизма действия данного соединения на клетки. Прежде всего, данный полимер не проникает в клетку.

30%-й раствор ПЭО-1500, обладающий криопротекторной эффективностью в отношении эритроцитов человека, оказывает значительное осмотическое давление на клетку, составляющее по данным криоскопического метода [7] порядка 2,0 osMol. ПЭО-1500 обладает поверхностно-активными свойствами [8], сорбируется на границе раздела фаз и способен изменять поверхностное натяжение раствора. Мультифакторный эффект ПЭО на клетки предполагает, что модификация Ca^{2+} -АТФазы, скорее всего, будет отражать результирующее действие структурных изменений, обусловленных процессами дегидратации и сорбции полимера вокруг мембраны, представляющей собой сложную систему, от динамики взаимодействия между компонентами которой, зависят функции транспортных и сигнальных систем.

Было показано, что под влиянием нарастающих концентраций ПЭО происходит изменение активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов. При разных температурах эта динамика носит неодинаковый характер. В условиях нормотермии добавление даже небольших концентраций криопротектора в среду ведет к ингибированию Ca^{2+} -АТФазной активности. В 30%-й концентрации ПЭО, обладающий выраженным криопротекторным эффектом, более чем в 3 раза снижает скорость ферментативной реакции. В гипотермических условиях ферментативная активность Ca^{2+} -насоса зрительно подавляется и становится нечувствительной к изменению содержания криопротектора.

На сапонин-перфорированных клетках было установлено, что как инкубация клеток с 30%-м

раствором ПЭО-1500, так и их замораживание под защитой данного криопротектора, сопровождается ингибированием ферментативной реакции. При этом наличие в среде эндогенных регуляторов Ca^{2+} -АТФазы не вносит каких-либо нюансов в изменение ее активности в сравнении с закономерностями, установленными на модели реконструированных клеток. Удаление криопротектора из среды позволяет восстановить функциональные показатели каталитической активности Ca^{2+} -насоса. Следовательно, подавление Ca^{2+} -АТФазной активности в эритроцитах обусловлено, в первую очередь, присутствием в среде поверхностно-активного соединения ПЭО-1500 и этот процесс является обратимым.

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что каталитическая активность Ca^{2+} -насоса эритроцитов изменяется под воздействием физико-химических факторов среды, что может быть существенным моментом адаптации метаболизма к стрессовым условиям криоконсервирования. При этом реакция на изменения состава окружающей среды и гипертонические эффекты может зависеть от температуры. В гипотермических условиях активность Ca^{2+} -АТФазы реконструированных эритроцитов нечувствительна к нарастанию в среде концентрации ПЭО-1500. По-видимому, температура способна вносить весьма значительную корреляцию в термодинамику последовательных реакций, составляющих каталитический цикл фермента. Как было отмечено в работе [9] Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) при 2 °С в течение нескольких миллисекунд после начала фосфорилирования обнаруживала устойчивое равновесное соотношение двух фосфомедиатов EP1/EP2, равное 1. Полагают, что разные фосфо-конформеры могут образовывать димеры и, стабилизируя друг друга, сохраняют устойчивое термодинамическое равновесие. Основываясь на значительном сходстве каталитического центра двух ферментов PMCA и SERCA, можно предположить, что и для Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран эти закономерности могут быть в определенной степени справедливы.

В нормотермических условиях ПЭО-1500 вызывает ингибирование Ca^{2+} -АТФазы реконструированных и сапонин-перфорированных эритроцитов. Поскольку способность транслоцировать ионы Ca^{2+} через мембрану зависит прежде всего от ферментативной активности, логичным следствием полученных результатов может быть предположение об увеличении концентрации Ca^{2+} в эритроцитах, инкубированных с ПЭО-1500. Даже в изотонических концентрациях ПЭО-1500 резко увеличивает скорость входа Ca^{2+}

в эритроциты [10]. Через 20 минут инкубирования эритроцитов в ПЭО-содержащей среде вход Ca^{2+} увеличивался 10-кратно. Очевидно, это может быть связано с торможением активности Ca^{2+} -АТФазы под действием ПЭО-1500 как одного из важных аспектов регуляции внутриклеточного Ca^{2+} .

Снижение активности Ca^{2+} -АТФазы в присутствии ПЭО-1500 и увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} могут повышать стабильность эритроцитов к действию неблагоприятных факторов, сопровождающих процессы низкотемпературного консервирования. Известно, что рост уровня Ca^{2+} индуцирует повышение жесткости мембраны и цитоскелета [11] и тем самым увеличивает механическую прочность эритроцитов. Однако, биохимические последствия роста Ca^{2+} могут иметь негативный эффект на стабильность клеток при их возвращении в физиологические условия.

Причины ингибирования Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах в присутствии ПЭО довольно сложно объяснить, поскольку однозначное представление о механизме действия данного полимера на мембранные структуры и макромолекулы отсутствует. Известно, что соединения ряда ПЭГ с разной молекулярной массой влияют на структуру липидного бислоя искусственных и природных мембран, изменяя температуру и термодинамические параметры фазовых переходов в липидных везикулах, вызывают агрегацию и слияние искусственных мембранных систем и клеток [12]. Однако механизм этих эффектов ПЭО не имеет однозначной интерпретации. Высказывается предположение о возможности непосредственного взаимодействия ПЭГ с мембранами, основываясь на его способности вытеснять спиновые метки из плазматических мембран [13]. Поскольку ПЭГ относят к неионным поверхностно-активным веществам, то при взаимодействии с мицеллами и клетками он может образовывать вокруг них своеобразную покровную оболочку с измененными свойствами воды, которая находится внутри такой "мантии". Эта вода обладает меньшей диэлектрической проницаемостью, чем фракция свободной несвязанной воды в растворе. Изменение термодинамических свойств воды в окружении Ca^{2+} -АТФазы под такой "мантией" из молекул ПЭО может существенно замедлять скорость реакции, поскольку определенным образом влияет на изменение свободной энергии конформационных переходов, связанных с внутримолекулярными движениями доменов Ca^{2+} -насоса, экспонированных на внешнюю поверхность мембраны. Именно модификация физико-химических свойств растворителя, вызванная введением

в среду ПЭГ, как считают [14], а не прямое взаимодействие с мембраной, лежит в основе изменений ее структуры. Вместе с тем необходимо учитывать, что растворы ПЭГ, используемые для криозащиты биообъектов, обладают значительным осмотическим давлением, вызывают дегидратацию клеток, в том числе и дегидратацию плазматических мембран. Это может в определенной степени повлиять на характер его взаимодействия с биологическими структурами. К этому следует также добавить, что ПЭО-1500 обладает значительной липофильностью. Изменение микровязкости липидов и возмущение структуры под влиянием ПЭГ могут способствовать встраиванию криопротекторов в мембрану. При этом стерическое соответствие молекул вещества размеру динамических дефектов бислоя может играть определенную роль в этом процессе [15]. Таким образом, изменение свойств раствора, возможность встраивания молекул в структуру липидного бислоя, образование “мантии” вокруг клетки, состоящей из молекул ПЭО – все это может вызвать значительные изменения в механизме функционирования Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов под воздействием криопротектора.

Выводы

1. ПЭО-1500 вызывает снижение активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов. При гипотермии функция фермента резко падает и становится невосприимчивой к воздействию нарастающих концентраций криопротектора.

2. Процесс ингибирования Ca^{2+} -АТФазной активности ПЭО-1500 носит обратимый характер.

Литература

1. *Lew V. L., Daw N., Perdomo D. et al.* Distribution of plasma membrane Ca^{2+} pump activity in normal human red blood cells // *Blood.*– 2003.– Vol.102, N12.– P. 4206-4213.
2. *Valeri C.R., Ragno G., Pivacek L.E. et al.* An experiment with glycerol frozen red blood cells stored at – 80 degrees C for up to 37 years // *Vox Sang.*– 2000.– Vol.79, N3.– P. 168-174.
3. *Babijchuk L. A., Zemlyanskikh N. G., Belous A. M.* The role of cytoskeletal proteins in cell stability // *Cell Biology International.*– 1997.– Vol. 21, N12.– P. 847-849.
4. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*– 1976.– Vol. 7, N72.– P. 248-254.
5. *Покудин Н.И., Петруняк В.В., Орлов С.Н.* Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах *in vivo* // *Биохимия.*– 1988.– Vol. 53, N5.– С. 753-758.
6. *Rathbum W., Betlark V.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the present of cystein and adenosin triphosphate // *Anal. Biochem.*– 1969.– Vol. 28, N1-3.– P. 436-445.

7. *Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф.* Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями // *Криобиология и криомедицина.*– 1980. – Вып. 7.– С. 40-44.
8. *Новиков А.Н., Липина О.В., Олейник С.Т.* Адсорбционная активность этиленгликоля и криопротекторов ряда ПЭО // *Криобиология и криомедицина.*– 1983.– Вып.13.– С. 39-42
9. *Mahaney J.E., Thomas D.D., Froehlich J.P.* The time-dependent distribution of phosphorylated intermediates in native sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase from skeletal muscle is not compatible with a linear kinetic model // *Biochemistry.*– 2004.– Vol. 43, N14.– P. 4400-4416.
10. *Kucherenko Yu. V., Schetinskiy M. J., Nardid O. A., Bernhardt I.* Ca^{2+} influx in human erythrocytes in low ionic strength media depends on the nature of the saline substitute. Effects of sucrose and polyethylene glycol 1500 // 15th Meeting of European Association for Red Cell Research.– Murten, Switzerland, 2005.– P. 89.
11. *Liu F., Mizukami H., Sarnaik S. et al.* Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy // *J. Struct. Biol.*– 2005.– Vol.150, N2.– P. 200-210.
12. *Morgan C.G., Thomas E.W., Yianni Y.P.* The use of fluorescence energy transfer to distinguish between poly(ethylene glycol)-induced aggregation and fusion of phospholipid vesicles // *Biochim Biophys Acta.*– 1983.–Vol. 728, N3.– С. 356-362
13. *Boss W. F.* Poly(ethylene-glycole)-induced fusion of plant protoplast. A spin-label study // *Biochem. Biophys. Acta.*– 1983.– Vol. 730, N1.– P. 111-118.
14. *Pratsch L., Herrman A., Schwede I. et al.* The influence of poly(ethylene – glycol) on the molecular dynamics within the glycocalyx // *Biochem. Biophys. Acta.*– 1989.– Vol. 980, N2.– P. 146-154.
15. *Цымбал Л.В., Гаврилова И.И., Мусеев В.А.* Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов // *Криобиология.*– 1985.– №3.– С. 21-24.