

УДК 57.043:577.1:577.325.45

Н.Г. Землянских*, А.Ю. Никольченко, Л.А. Бабийчук

ПЭО-1500 ингибирует Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов человека

UDC 57.043:577.1:577.325.45

N.G. ZEMLYANSKIKH*, A.YU. NIKOLCHENKO, L.A. BABIYCHUK

PEO-1500 Inhibits Human Erythrocyte Ca^{2+} -ATPase

Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов человека обеспечивает поддержание и регуляцию уровня внутриклеточного кальция. Изменение ее функциональной активности при криоконсервировании играет важную роль в выживаемости клеток и сохранении ими структурной целостности. Экзоцеллюлярный криопротектор ПЭО-1500 приводит к ингибированию активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов уже на этапе инкубирования с ним клеток, а последующий цикл замораживания-отогрева ($-196...37^\circ\text{C}$) в его присутствии не влияет на установившийся режим работы данного фермента. Ингибирование, вызванное действием ПЭО-1500, носит обратимый характер и активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов восстанавливается после его разведения в клеточной суспензии, что необходимо для нормального функционирования криоконсервированных клеток в русле крови после трансфузии. Торможение работы Ca^{2+} -АТФазы связано, по-видимому, с модификацией физико-химических характеристик мембран под влиянием данного соединения.

Ключевые слова: эритроциты, Ca^{2+} -АТФаза, криоконсервирование, криопротектор, полиэтиленоксид.

Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов людини забезпечує підтримку і регуляцію рівня внутрішньоклітинного кальцію. Зміна її функціональної активності при криоконсервуванні виконує важливу роль у виживаності клітин і збереженні їх структурної цілостності. Екзоцелюлярний криопротектор ПЕО-1500 призводить до інгібування активності Ca^{2+} -АТФазы еритроцитів вже на етапі інкубації з ним клітин, а подальший цикл заморожування-відігрівання ($-196...37^\circ\text{C}$) в його присутності не впливає на встановлений режим роботи даного ферменту. Інгібування, яке викликане дією ПЕО-1500, носить оборотний характер і активність Ca^{2+} -АТФазы еритроцитів відновлюється після його розведення в клітинній суспензії, що необхідно для нормального функціонування криоконсервованих клітин в руслі крові після трансфузії. Гальмування роботи Ca^{2+} -АТФазы може бути пов'язане з модифікацією фізико-хімічних характеристик мембран під впливом даної сполуки.

Ключові слова: еритроцити, Ca^{2+} -АТФаза, криоконсервування, криопротектор, поліетиленоксид.

Human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase provides the maintenance and regulation of intercellular calcium level. Change in its functional activity under cryopreservation plays an important role in cell survival and structural integrity preservation. PEO-1500 exocellular cryoprotectant inhibits erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity at incubation stage but the following freeze-thawing cycle ($-196...37^\circ\text{C}$) in its presence does not affect the settled regimen of this enzyme functioning. The inhibition caused by PEO-1500 effect has a reversible character and the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity is recovered after its dilution in cell suspension that is essential for cryopreserved cell normal functioning in blood bed after transfusion. The inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity is apparently associated to physical and chemical membrane modification under this compound effect.

Key-words: erythrocytes, Ca^{2+} -ATPase, cryopreservation, cryoprotectant, polyethylene oxide.

Изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} под воздействием внешнего сигнала (гормона, нейромедиатора и т.д.) регулирует структурно-функциональное состояние многих клеточных систем [13]. В эритроцитах человека единственным механизмом, обеспечивающим контроль за поддержанием его уровня в цитоплазме, является Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны [2]. На молекулярном уровне транспортная функция Ca^{2+} осуществляется двумя изоформами данного фермента – PMCA1b и PMCA4b [20]. Энзиматические характеристики активности Са-насоса эритроцитов определяются структурными особенностями

Change in intracellular Ca^{2+} concentration under external signal effect (hormone, neuromediator etc.) regulates structural and functional state of many cell systems [13]. In human erythrocytes the single mechanism, controlling the maintenance of its level in cytoplasm is plasma membrane Ca^{2+} -ATPase [2]. In a molecular level the Ca^{2+} transport function is realised by two isoforms of this enzyme: PMCA1b and PMCA4b [20]. Enzymatic characteristics of erythrocyte Ca-pump activity are determined by structural peculiarities of these two forms presented in cells. Ca^{2+} -ATPase activity may be modified under the effect of different regulatory effects [17]. The enzyme

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya
str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57
373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

этих двух изоформ, присутствующих в клетках. Активность Ca^{2+} -АТФазы может быть модифицирована под влиянием различных регуляторных эффектов [17]. Фосфорилирование фермента протеинкиназами А и С, протеолиз под действием кальпаина, взаимодействие с кальмодулином усиливают активность Са-насоса [17, 20]. Ионы Ca^{2+} способны как активировать, так и ингибировать ферментативную реакцию гидролиза АТФ Ca^{2+} -АТФазой [2, 10]. Важную роль в регуляции функциональной активности Ca^{2+} -АТФазы играют липидные компоненты мембраны [2, 10, 17, 20], поэтому структурное состояние и состав липидного бислоя, которые зависят от температуры и влияния ряда химических агентов, могут существенно влиять на работу Ca^{2+} -насоса. Принимая во внимание исключительную роль Ca^{2+} -АТФазы в регулировании концентрации Ca^{2+} в эритроцитах, исследование изменений ее функциональной активности в процессе криоконсервирования является важным аспектом в понимании механизмов выживаемости клеток и сохранении ими структурной целостности после замораживания-отогрева.

В процессе криоконсервирования эритроцитов используются различные криопротекторы, предназначенные для защиты биологических систем от физико-химических факторов, сопровождающих процессы замораживания-отогрева клеточных суспензий и нарушающих барьерную функцию мембраны [3].

Наряду с глицеролом, в последнее время активно исследуется полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) [1]. Одним из важных аспектов исследования действия данного вещества может быть изучение модификации функционирования Ca^{2+} -АТФазы на разных этапах криоконсервирования, что позволит установить роль Ca^{2+} в повреждении субклеточных структур или возможность вовлечения Ca^{2+} -индуцированных изменений в адаптацию клеток к экстремальным неблагоприятным условиям криоконсервирования. Особенность механизма защитного действия ПЭО-1500 в процессе криоконсервирования эритроцитов связана со способностью данного вещества оказывать криопротекторный эффект, не проникая в клетки. Эффективность ПЭО-1500 в качестве криопротектора [1] зависит от начальной температуры экспонирования клеток в растворах данного вещества. Инкубация эритроцитов с ПЭО-1500 в диапазоне температур 0-4°C на этапе, предшествующем замораживанию, способствует большей сохранности клеток после криоконсервирования в сравнении с инкубацией при более высоких температурах.

Цель данного исследования – анализ изменений активности Са-АТФазы эритроцитов человека под

phosphorylation with protein kinases A and C, proteolysis under calpain effect, as well as interaction with calmodulin enhance the Ca-pump activity [17, 20]. Ca^{2+} ions are capable either to activate or inhibit an enzyme reaction of ATP hydrolysis with Ca^{2+} -ATPase [2, 10]. An important role in regulating Ca^{2+} -ATPase functional activity belongs to membrane lipid components [2, 10, 17, 20], therefore a structural state and composition of lipid bilayer, dependent on temperature and influence of some chemical agents may significantly affect the Ca^{2+} -pump activity. Taking into consideration an exceptional role of Ca^{2+} -ATPase in regulating Ca^{2+} concentration in erythrocytes, study of the changes in Ca^{2+} -ATPase functional activity in the process of cryopreservation is of importance for understanding the mechanisms of cell survival and preserving structural integrity after freeze-thawing.

Different cryoprotectants, designed to protect biological systems against chemical factors, accompanying cell suspension freeze-thawing processes and impairing a membrane barrier function are applied under erythrocyte cryopreservation [3].

Polyethylene oxide with 1500 molecular weight (PEO-1500) has been recently actively investigated along with glycerol [1]. One of the important aspects in investigating this substance effect may be the study of Ca^{2+} -ATPase functioning modification at different cryopreservation stages, that will enable to establish the Ca^{2+} role either in damaging subcellular structures or a possibility to involve Ca^{2+} -induced changes in cell adaptation to extreme unfavourable cryopreservation conditions. The peculiarity of PEO-1500 protective effect mechanism during erythrocyte cryopreservation is associated to this substance capability to cause a cryoprotective effect without penetrating into cells. PEO-1500 efficiency as a cryoprotectant [1] depends on an initial temperature of cell exposure in this substance solutions. Erythrocyte incubation with PEO-1500 within 0-4°C temperature range at the stage being preceded to freezing, contributes to a higher cell integrity after cryopreservation compared to the incubation under higher temperatures.

This research was aimed to analyse the changes in human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity under PEO-1500 exocellular cryoprotectant effect at low temperature preservation different stages, including those of preliminary cell incubation in cryopreservative solution and transfusion simulation of frozen-thawed erythrocytes.

Materials and methods

Such reagents as: Trizma base (Sigma), ATP-disodium (Sigma), HEPES, EGTA ("Serva"), CaCl_2 (Sigma), Saponin (Fluka), KCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and other reagents of Ukrainian and Russian production (chemically pure or especially pure grades) have been used in the work.

влиянием экзоцеллюлярного криопротектора ПЭО-1500 на различных стадиях низкотемпературного консервирования, включая этапы предварительного инкубирования клеток в растворе криоконсерванта и моделирования трансфузии деконсервированных эритроцитов.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: Trizma base (Sigma), ATP-disodium (Sigma), HEPES, EGTA ("Serva"), CaCl₂ (Sigma), Saponin (Fluka), KCl, MgCl₂·6H₂O и другие реактивы производства Украины и России (х.ч. или о.с.ч.).

Объектом исследования служили эритроциты II (A) группы донорской крови мужчин, заготовленной на консерванте "Глюгидир". Исследования проводили на 3-5-е сутки гипотермического хранения крови.

Эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-3). После удаления плазмы и лейкоцитарного слоя эритроциты трижды промывали 3-4-кратными объемами среды В (150 mM NaCl, 10 mM Трис-НCl, pH 7,4).

В работе использовали 30%-й раствор ПЭО-1500 на основе среды В. Раствор консерванта добавляли к эритроцитам в равном объеме и инкубировали в течение 30 мин при 37°C или температуре, колеблющейся в диапазоне 0-4°C. Перед началом инкубации температура эритроцитарной массы и растворов была скорректирована заранее в соответствии с условиями инкубации. Часть эритроцитов после инкубации с ПЭО-1500 при разных температурах была использована для замораживания путем быстрого погружения контейнеров в жидкий азот (-196°C). Криоконсервированную суспензию эритроцитов отогревали на водяной бане при температуре 42-44°C с постоянным покачиванием. Для контроля использовали эритроциты, инкубированные в среде В при температурах 37 и 0-4°C в течение 30 мин.

Перед началом определения АТРазной активности эритроциты, подвергнутые указанным выше экспериментальным воздействиям, либо осаждали центрифугированием при 1000 об/мин (ОПН-3), либо к одному объему эритроцитарной суспензии добавляли 9 объемов среды В (моделируя разбавление криопротектора в русле крови при трансфузии деконсервированных эритроцитов) и затем центрифугированием осаждали клетки в аналогичном режиме.

Аликвоты эритроцитов из полученных осадков отбирали для анализа изменений активности Ca²⁺-АТРазы под влиянием ПЭО-1500 и температурных воздействий. Оценку активности Ca-АТРазы проводили по методу, описанному в работе [8], с некоторыми модификациями.

Men donor II (A) blood erythrocytes, procured with "Glygicir" preservative served as the investigation object. Investigations were carried-out to the 3rd-5th days of blood hypertonic storage.

Erythrocytes were pelleted with centrifugation at 3000 rot/min (OPN-3 centrifuge). After plasm and buffy coat removal the erythrocytes were thrice rinsed with 3-4-fold volumes of medium B (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4).

In research we used a 30% solution of PEO-1500 in medium B. Preservative solution was added into erythrocytes in an equal volume and incubated for 30 min at 37°C temperature or at that, varying within 0-4°C range. Before starting incubation the erythroconcentrate and solution temperature was previously corrected according to the incubation conditions. A part of erythrocytes after incubating with PEO-1500 under different temperatures was used for freezing when containers were rapidly immersed into liquid nitrogen (-196°C). Cryopreserved erythrocyte suspension was thawed on water bath at 42-44°C. The erythrocytes, incubated in B medium at 37 and 0-4°C for 30 min served the control.

Before starting the ATPase activity detection the erythrocytes subjected to the above mentioned experimental effects were either pelleted by centrifugation at 1000 rot/min (OPN-3) or 9 volumes of medium B were added to one volume of erythrocyte suspension (by modelling cryoprotectant dilution into blood bed during frozen-thawed erythrocyte transfusion) and then cells were pelleted by centrifugation with the same regimen.

Erythrocyte aliquots derived from pellets were selected to analyse the changes in Ca²⁺-ATPase activity under PEO-1500 influence and temperature effects. Estimation of Ca²⁺-ATPase activity was performed using the method, described in the paper [8] with certain modifications.

A part of erythrocytes was transferred into the A medium, containing 0.04% saponin, 130 mM KCl, 20 mM HEPES, 20 mM Tris (pH 7.4), 0.25 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM EGTA and 1.055 mM CaCl₂ (that corresponded to the concentration of about 10 μM for a free Ca²⁺ [8]), the second part was added into the same A medium but free of CaCl₂. Hematocrit in the incubation medium made 10%. The reaction was carried-out at 37°C and for a part of experiments it was done at 0-4°C. The Ca²⁺-ATPase activity was judged by the difference of inorganic P accumulation in calcium-containing and calcium-free media. Reaction was stopped in 20 min with adding cold TCA solution up to 5% final concentration. Protein was precipitated with centrifugation at 900 g.

An amount of inorganic phosphorus in samples was determined according to the method [18]. After protein precipitation 100 ml of supernatant were added into

Часть эритроцитов переносили в среду А, содержащую 0,04% сапонины, 130 мМ КСl, 20 мМ HEPES, 20 мМ Трис (рН 7,4), 0,25 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 1 мМ EGTA и 1,055 мМ СаCl₂ (что соответствует концентрации свободного Са²⁺ примерно 10 мкМ [8]), вторую часть добавляли в ту же среду А, но не содержащую СаCl₂. Гематокрит в инкубационной среде составлял 10%. Реакцию проводили при температуре 37°C и для части экспериментов – при 0-4°C. Об активности Са²⁺-АТРазы судили по разности накопления неорганического Р в кальций-содержащей и бескальциевой средах. Реакцию останавливали через 20 мин добавлением холодного раствора ТХУ до конечной концентрации 5%. Белок осаждали центрифугированием при 900 g.

Количество неорганического фосфора в пробах определяли по методу [18]. После осаждения белков 100 мкл надосадочной жидкости добавляли к 2 мл 1,5 М ацетатного буфера (CH₃COOH-CH₃COONa, рН 4,3), содержащего 3,7% формальдегида и 10 % этанола. После чего к каждой пробе последовательно добавляли по 0,1 мл 2%-го раствора молибдата аммония и по 0,2 мл приготовленного *ex tempore* 6,75 мМ SnCl₂. Пробы колориметрировали при длине волны 660 нм на спектрофотометре Ломо СФ-46. Калибровочная прямая была линейной до 10 мкг неорганического фосфора в пробе. Результаты статистически обрабатывали с использованием программы Statgraphics plus 2.1 for Windows. Объем выборки в каждой экспериментальной группе n=10. Для оценки достоверности различий экспериментальных данных применяли t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Замораживание эритроцитов без криопротектора приводит к полной гибели клеток в результате нарушения целостности структуры плазматической мембраны. Оценка функциональной активности Са²⁺-АТРазы после замораживания эритроцитов позволяет определить устойчивость данной системы транспорта катионов в составе мембранного комплекса к действию низких температур. Как видно на рис. 1, а, б, АТРазная активность Са²⁺-насоса эритроцитов после замораживания эритроцитов без криопротектора не отличается от контрольных значений. Аналогичные результаты были получены и при изучении АТРазной активности везикул саркоплазматического ретикулума [5], подвергнутых быстрому однократному замораживанию в жидком азоте. Медленное замораживание мембран саркоплазматического ретикулума до -196°C приводит к активации Са²⁺-АТРазы, однако способность Са²⁺-насоса аккумулировать Са²⁺ в этих условиях резко падает, что свидетельствует о разобщении каталитической и ионтранс-

2 ml of 1.5 M acetate buffer (CH₃COOH-CH₃COONa, рН 4.3), containing 3.7% formaldehyde and 10% ethanol. Afterwards 2% ammonium molybdate solution and 6.75 mM SnCl₂ prepared *ex tempore* were gradually added to each sample (by 0.1 and 0.2 ml, correspondingly). Samples' calorimetry was performed at 600 nm wavelength with LOMO SP-46 spectrophotometer. Calibration line was linear up to 10 µg inorganic phosphorus in a sample. Results were statistically processed using Statgraphics plus 2.1 for Windows Software. Volume of sampling in each experimental group, n, made 10. To estimate the statistical significance of differences between experimental data the Student t-criterion was applied.

Results and discussion

Cryoprotectant-free erythrocyte suspension freezing-thawing results in a complete cell death due to the integrity impairment in plasma membrane structure. Estimation of Са²⁺-АТРазе functional activity after erythrocyte freezing enabled to determine this cation transport system resistance as a part of membrane complex to low temperature effect. The Fig. 1, a, b shows that the АТРазе activity of erythrocyte Са²⁺-pump after cryoprotectant-free erythrocyte freezing does not differ from the control values. The similar results were also obtained when studying АТРазе activity of sarco-plasmic reticulum vesicles [5], subjected to a rapid single freezing in liquid nitrogen. Slow freezing of sarcoplasmic reticulum membrane down to -196°C results in Са²⁺-АТРазе activation, but the Са²⁺-pump ability to accumulate Са²⁺ under these conditions sharply decreases, that testifies to disintegration of catalytic and ion-transporting functions [21]. The evaluation of low temperature effect on PMCA activity in erythrocytes under stationary conditions could not provide a complete idea about Са²⁺-transporting system state, however under these conditions the structure of catalytic center has apparently remained undamaged.

Preservation of cell integrity during low temperature effect, that requires the cryoprotectant application, results not only in modification of physical and chemical medium parameters but also considerably affects biological systems. PEO-1500 cryoprotectant does not penetrate into cells and directly affects only an external side of erythrocyte plasma membrane. But its solution, applied for cryopreservation causes an osmotic shrinking, that results in a concentration change of all intracellular components and a decrease in solvent (water) content. This may be a significant factor to modify the enzyme responses that reflects in changing the rate and character of protein conformational transitions. Erythrocyte incubation with cryoprotectant at 37°C and within the 0-4°C range (Fig. 1, c, d) leads to almost two-fold decrease in Са²⁺-АТРазе

портирующей функций [21]. Оценка влияния низких температур на активность РМСА в эритроцитах в стационарных условиях, конечно, не дает полного представления о состоянии Ca^{2+} -транспортной системы, вместе с тем структура каталитического центра в этих условиях, по-видимому, остается не поврежденной.

Сохранение целостности клеток в процессе низкотемпературного воздействия, предполагающее использование криопротекторов, влечет за собой не только модификацию физико-химических параметров среды, но и оказывает значительное влияние на биологические системы. Криопротектор ПЭО-1500 не проникает в клетки и непосредственно влияет только на внешнюю сторону плазматической мембраны эритроцитов. Однако его раствор, используемый для криоконсервирования, вызывает осмотическое сжатие, что ведет к изменению концентрации всех компонентов внутриклеточного содержимого и уменьшению концентрации растворителя (воды). Это может быть существенным фактором для модификации ферментативных реакций, что находит свое отражение в изменении скорости и характера конформационных переходов белков. Инкубация эритроцитов с криопротектором при 37°C и в диапазоне $0-4^\circ\text{C}$ (рис. 1, в, д) приводит к снижению активности Ca^{2+} -АТФазы почти в 2 раза независимо от температуры, при которой ПЭО-1500 воздействует на клетки. Различия, связанные с температурой инкубации эритроцитов с криопротектором, статистически не обнаруживаются, если ферментативный гидролиз АТФ происходит при 37°C . Но в реальных условиях, когда эритроциты инкубируются с ПЭО-1500 при разных температурах, ферментативная реакция, катализируемая Ca^{2+} -АТФазой, также происходит в клетке в различных температурных условиях. В связи с этим были проведены эксперименты, в которых после инкубации эритроцитов с ПЭО-1500 при температуре $0-4^\circ\text{C}$ клеточная суспензия была разделена на две части, и оценку ферментативной активности Ca^{2+} -АТФазы проводили при нормотермических условиях или при сохранении гипотермии. Как видно из рис. 2, а, б, температура влияет на функциональную активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, оцениваемую в условиях выбранной нами модельной системы. Использование других экспериментальных подходов может выявить несколько иные особенности температурного влияния на данную каталитическую реакцию, поскольку характеристики работы Ca^{2+} -АТФазы очень сильно зависят от применяемого методического подхода [7]. При инкубации клеток с ПЭО-1500 снижение температуры оказывает дополнительный ингибирующий эффект на Ca^{2+} -АТФазу (рис. 2, г). В этих условиях активность фермента

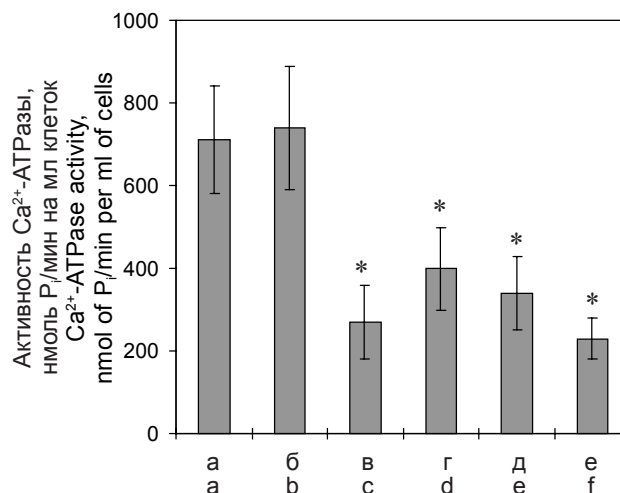


Рис. 1. Активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии непроницающего криопротектора ПЭО-1500 и при действии низких температур: а – нативные эритроциты (37°C); б – эритроциты, замороженные без криопротектора до -196°C ; в – эритроциты, инкубированные с ПЭО-1500 при 37°C ; г – криоконсервированные эритроциты, преинкубированные с ПЭО-1500 при 37°C ; д – эритроциты, инкубированные с ПЭО-1500 при температуре $0-4^\circ\text{C}$; е – криоконсервированные эритроциты, преинкубированные с ПЭО-1500 при температуре $0-4^\circ\text{C}$; * – выборки достоверно отличаются от контроля с уровнем значимости $P < 0,05$.

Fig. 1. Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocytes in presence of PEO-1500 non-penetrative cryoprotectant and under low temperature effect: a – native erythrocytes (37°C); b – cryoprotectant-free frozen erythrocytes down to -196°C ; c – cells incubated with PEO-1500 at 37°C ; d – cryopreserved erythrocytes, preliminarily incubated with PEO-1500 at 37°C ; e – those, incubated with PEO-1500 at $0-4^\circ\text{C}$; f – cryopreserved erythrocytes, preliminarily incubated with PEO-1500 at $0-4^\circ\text{C}$; * – samplings statistically and significantly differ from the control with $P < 0.05$ significance level.

activity independently on the temperature at which PEO-1500 affects the cells. Differences associated to the temperature of erythrocyte incubation with cryoprotectant are not statistically revealed if the ATP enzyme hydrolysis occurs at 37°C . But under actual conditions when erythrocytes are incubated with PEO-1500 under different temperatures an enzyme reaction, catalysed by Ca^{2+} -ATPase occurs in cell under various temperature conditions as well. That is why cell suspension was divided in two parts after erythrocyte incubation with PEO-1500 at $0-4^\circ\text{C}$ and the estimation of Ca^{2+} -ATPase enzyme activity was carried out under both normothermic conditions and hypothermia. As the Fig. 2, a, b shows, the temperature affects the Ca^{2+} -ATPase functional activity of erythrocytes, being estimated in the model system selected by us. The usage of other experimental approaches may reveal slightly different peculiarities of temperature effect on this catalytic reaction, since the characteristics of Ca^{2+} -ATPase activity mostly depends on the applied methodical approach [7]. When incubating cells with

ниже в сравнении не только с контролем (рис. 2, а), но и с эритроцитами, инкубированными с ПЭО-1500 при 0-4°C с последующей оценкой функционирования Ca²⁺-АТФазы в нормотермических условиях (рис. 2, в). Учитывая, что ПЭО-1500 изменяет текучесть липидного бислоя [3], мы ожидали, что он способен поддерживать функциональную активность Ca²⁺-АТФазы на более высоком уровне при снижении температуры ферментативного гидролиза в сравнении с нативными эритроцитами (рис. 2, б, г). Однако установить достоверно значимых различий не удалось. По-видимому, торможение, вызванное термодинамическими причинами [11], превалирует над физико-химической модификацией мембраны в контроле скорости ферментативной реакции, осуществляемой Ca²⁺-зависимой АТФазой.

Криоконсервирование эритроцитов под защитой ПЭО-1500 не вносит существенных изменений в режим работы Ca²⁺-АТФазы, который устанавливается на этапе инкубирования клеток с данным криопротектором. Сравнение ферментативной активности Ca²⁺-транспортирующей системы эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500 при различных температурах (см. рис. 1, в, д) с аналогичными вариантами после замораживания-отогрева клеток (см. рис. 1, г, е), не выявляет статистически достоверных различий. Не обнаруживаются различия и между двумя группами деконсервированных эритроцитов, отличавшихся изначально температурными режимами экспонирования клеток с криопротектором (см. рис. 1, д, е). В данных условиях все экспериментальные группы достоверно отличаются только от контроля и эритроцитов, замороженных без криопротектора. Следовательно, основной причиной изменения активности Ca²⁺-АТФазы эритроцитов является модификация мембраны под влиянием ПЭО-1500, а эффекты низкотемпературного консервирования в этих условиях не проявляются.

Полученные результаты свидетельствуют, что ингибирующий эффект ПЭО-1500 обусловлен его непосредственным присутствием в среде и не связан, по-видимому, с какой-либо спецификой взаимодействия ПЭО-1500 с клетками при различных температурах, поскольку уровень активности Ca²⁺-АТФазы эритроцитов, инкубированных с криопротектором при различных температурах, не имеет достоверных отличий при нормотермических условиях проведения ферментативной реакции.

Возникает вопрос об обратимости изменений данной функциональной системы эритроцитов после удаления криопротектора. Безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов под защитой ПЭО-1500 позволяет переливать реци-

PEO-1500 a temperature decrease causes an additional inhibiting effect on Ca²⁺-ATPase (Fig. 2, d). Under these conditions the enzyme activity is lower compared not only to the control (Fig. 2, a), but the erythrocytes, incubated with PEO-1500 at 0-4°C with following estimation of Ca²⁺-ATPase functioning under normothermic conditions (Fig. 2, c). Taking into account the fact that PEO-1500 changes the lipid bilayer fluidity [3] we expected it to be capable of Ca²⁺-ATPase functional activity maintaining at a higher level in the process of enzyme hydrolysis at a reduced temperature compared to native erythrocytes (Fig. 2 b, c). However we did not manage to establish the statistically significant differences. Apparently, the inhibition caused by thermodynamic reasons [11] dominates the physical and chemical membrane modifications in controlling the rate of enzyme reaction, realised by Ca²⁺-dependent ATPase.

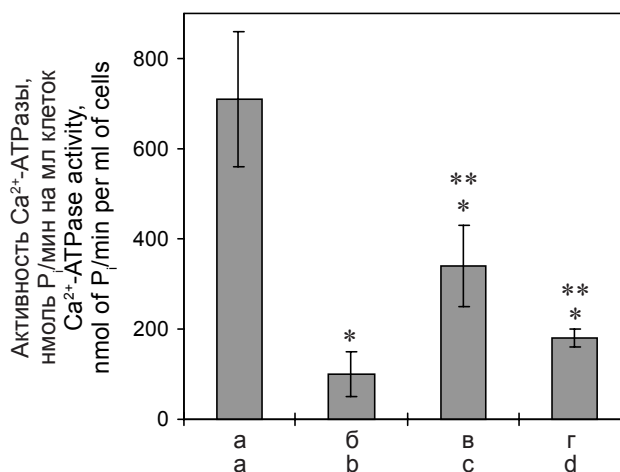


Рис. 2. Влияние температуры на активность Ca²⁺-АТФазы эритроцитов в присутствии непроницающего криопротектора ПЭО-1500: а – нативные эритроциты (37°C) с последующим определением активности при той же температуре; б – нативные эритроциты (0-4°C) с последующим определением активности при той же температуре; в – эритроциты, инкубированные с ПЭО-1500 при температуре 0-4°C, с последующим определением активности при 37°C; г – эритроциты, инкубированные с ПЭО-1500 при 0-4°C, с последующим определением активности при данной температуре; * – отличия достоверны от контроля с уровнем значимости P<0,05; ** – достоверные различия при сравнении экспериментальных групп в и г с уровнем значимости P<0,05.

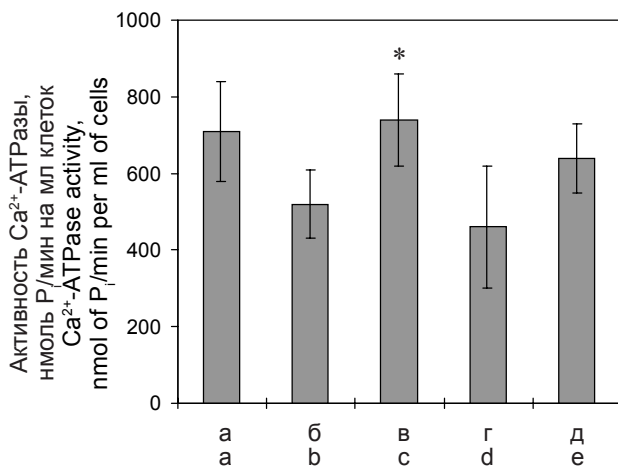
Fig. 2. Temperature effect on erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity in presence of PEO-1500 non-penetrative cryoprotectant: a – native erythrocytes (37°C) with following activity determination at the same temperature; b – those (0-4°C) with following activity determination at the same temperature; c – erythrocytes incubated with PEO-1500 at 0-4°C with following activity determination at 37°C; d – those incubated with PEO-1500 at 0-4°C with following activity determination at this temperature; * – differences are statistically significant compared to the control with P<0.05 significance level; ** – differences are statistically significant when comparing data of groups c and d with P<0.05 significance level.

пиентам кровь после размораживания без удаления криопротектора. В кровеносном русле происходит постепенное снижение его концентрации. Процесс разбавления ПЭО-1500 моделировали в экспериментальных условиях, добавляя физиологический раствор в суспензию клеток. Такой методический подход был применен к клеткам, подвергнутым инкубированию с ПЭО-1500, и к эритроцитам, замороженным под его защитой. Следует отметить, что разбавление криоконсервированных клеток изотонической средой сопровождается гемолизом (~25%). Представленные на рис. 3 данные свидетельствуют о восстановлении функциональной активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов после разбавления ПЭО-1500, что предполагает обратимость торможения, возникающего под влиянием криопротектора. Все экспериментальные варианты не имеют достоверных отличий от контроля. Вместе с тем можно выделить две особенности восстановления Ca^{2+} -АТФазной активности эритроцитов, связанные с температурными условиями. Во-первых, наиболее ярко выраженное восстановление активности Ca^{2+} -АТФазы после разбавления ПЭО-1500 в клеточных суспензиях отмечается в группах криоконсервированных эритроцитов. Возможно, причина, объясняющая эту особенность, связана с гетерогенностью популяции эритроцитов и неодинаковой устойчивостью клеточных субпопуляций в процессе криоконсервирования. Эритроциты на этапе инкубирования с ПЭО-1500 полностью сохраняют свою целостность и активность Ca^{2+} -АТФазы представлена усредненными показателями всех субпопуляций эритроцитов. Известно, что в старых эритроцитах уровень внутриклеточного кальция выше, чем в молодых клетках, что связывают с торможением активности Ca^{2+} -АТФазы [19]. Старые эритроциты чувствительны к различным неблагоприятным воздействиям и, вероятно, первыми погибают при криоконсервировании. Поэтому их удаление в результате гибели при замораживании и последующем разведении клеточной суспензии изотоническим раствором из эритроцитомассы, в которой определяется активность Ca^{2+} -АТФазы, обуславливает ее более высокие значения. Во-вторых, мы обнаружили при сравнении двух групп, отличающихся начальными температурными условиями экспонирования эритроцитов с ПЭО-1500 (рис. 3, б, в) и (рис. 3, г, д), что тенденция восстановления Ca^{2+} -АТФазной активности в большей мере проявляется для клеток, инкубированных с криопротектором при температуре 0-4°C. Как показали проведенные исследования [4], температура может модулировать взаимодействие ПЭО-1500 с биологическими мембранами. При понижении температуры количество ПЭО-1500, образующего

Erythrocyte cryopreservation under PEO-1500 protection does not significantly change the Ca^{2+} -ATPase activity regimen, settled at the stage of cell incubation with this cryoprotectant. Comparing the enzyme activity of Ca^{2+} -transporting system of erythrocytes, incubated with PEO-1500 under various temperatures (see Fig. 1, c, d) with similar versions after cell freeze-thawing (Fig. 1, d, e) does not reveal statistically significant differences. No differences between two groups of frozen-thawed erythrocytes, originally differing by temperature regimens of cell exposure with cryoprotectant were revealed (Fig. 1, e, f). Under these conditions all experimental groups statistically and significantly differ from the control and cryoprotectant-free frozen erythrocytes only. Consequently, the main reason of change in erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity is the membrane modification under PEO-1500 effect, but the effects of low temperature preservation under these conditions are not revealed.

The results obtained testify to the fact that an inhibiting PEO-1500 effect is stipulated by its direct presence in the medium and is not apparently associated to any specificity of PEO-1500 interaction with cells under various temperatures, because the level of erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity, incubated with cryoprotectant under different temperatures has no statistically significant differences under normothermic conditions of enzyme reaction performance.

The question arises about a reversible character of changes in this functional erythrocyte system after cryoprotectant removal. Washing-out free method for erythrocyte cryopreservation under PEO-1500 protection enables transfusion of blood to recipients after freeze-thawing without cryoprotectant removal. A gradual decrease in its concentration occurs in a blood bed. The process of PEO-1500 dilution was simulated under experiment conditions by adding physiological solution into cell suspension. This methodical approach was applied to cells, incubated with PEO-1500 and to erythrocytes, frozen under its protection. Of note is the fact that the cryopreserved cell dilution with isotonic medium is accompanied with hemolysis (~25%). The data presented in Fig. 3 testify to the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase functional activity recovery after PEO-1500 dilution that suggests the reversible character of inhibition, occurring under cryoprotectant effect. All experimental variants have no statistically significant differences from the control. However two peculiarities of erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity recovering, associated to the temperature conditions may be emphasised. First, the most manifested Ca^{2+} -ATPase activity recovery after PEO-1500 dilution in cell suspension is observed in cryopreserved erythrocyte groups. The reason, explaining this peculiarity is probably associated to the heterogeneity in erythrocyte



достаточно прочные связи с мембранами, уменьшается. Поэтому при разведении суспензии эритроцитов физиологическим раствором количество остаточного ПЭО-1500 в мембранах будет меньше в условиях экспонирования клеток с криопротектором при 0-4°C в сравнении с инкубацией при 37°C. Очевидно, это способствует лучшему восстановлению структурно-функциональных параметров мембраны. Обратимость ингибирующего эффекта ПЭО-1500 на Ca²⁺-АТФазную активность эритроцитов позволяет предположить, что после трансфузии эта функциональная система сможет нормально выполнять свою работу, что необходимо для поддержания и регуляции концентрации внутриклеточного Ca²⁺.

Изменения активности Ca²⁺-АТФазы эритроцитов играют важную роль в регуляции различных метаболических процессов [13, 17] и индуцируют определенную сбалансированность структурно-функционального состояния субклеточных систем в изменившихся условиях жизнедеятельности клеток. Подобным примером могут служить изменения в эритроцитах людей, страдающих гипертензией [14]. Как показали исследования, активность Ca²⁺-АТФазы сапонин-пермеабилizированных эритроцитов сохраняется после действия ультразвуковых температур, что свидетельствует о ее криостабильности. Однако применение криопротекторов для защиты клеток в процессе замораживания-отогрева влияет на каталитическую активность Са-насоса. Экзоцеллюлярный криопротектор ПЭО-1500 модифицирует параметры как вне- так и внутриклеточной среды в силу своей осмотической активности и адсорбционной способности [6]. Изменения активности Ca²⁺-АТФазы и уровня внутриклеточного кальция в данных условиях могут играть определенную роль в контроле метаболических процессов в эритроцитах. Поскольку во внеклеточной среде ионы Ca²⁺ содержатся в остаточных количествах, торможение Ca²⁺-АТФазной активности в эритроцитах под

Рис. 3. Влияние удаления криопротектора на активность Ca²⁺-АТФазы эритроцитов, инкубированных и криоконсервированных в присутствии непроницающего криопротектора ПЭО-1500: а – нативные эритроциты при 37°C; б – эритроциты, инкубированные с ПЭО-1500 при температуре 0-4°C; в – криоконсервированные эритроциты, преинкубированные с ПЭО-1500 при температуре 0-4°C; г – эритроциты, инкубированные с ПЭО-1500 при 37°C; д – криоконсервированные эритроциты, преинкубированные с ПЭО-1500 при 37°C; * – отличия достоверны в сравнении с аналогичным вариантом до разбавления криопротектора в суспензии.

Fig. 3. Effect of cryoprotectant removal on erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity incubated and cryopreserved in presence of PEO-1500 non-penetrative cryoprotectant: а – native erythrocytes at 37°C; б – erythrocytes incubated with PEO-1500 at 0-4°C; в – cryopreserved erythrocytes preliminarily incubated with PEO-1500 at 0-4°C; д – erythrocytes incubated with PEO-1500 at 37°C; е – cryopreserved ones, preliminarily incubated with PEO-1500 at 37°C; * – differences are statistically significant compared to the same variant before cryoprotectant dilution in suspension.

population. Erythrocytes at the stage of incubation with PEO-1500 entirely preserve their integrity and the Ca²⁺-ATPase activity is represented by averaged indices in all erythrocyte subpopulations. The level of intracellular calcium is known to be higher in senescent erythrocytes, than in young cells, that is related to the Ca²⁺-ATPase activity slowdown [19]. Senescent erythrocytes are sensitive to different unfavourable effects and are probably the first destroyed during cryopreservation. Therefore their removal because of death during freezing and following cell suspension dilution with isotonic solution from erythroconcentrate, where Ca²⁺-ATPase activity is determined, stipulates its higher values. Secondly, when comparing two groups differed by initial temperature conditions of erythrocyte exposure with PEO-1500 (Fig. 3, б, в) and (Fig. 3, д, е) we have revealed that the tendency of Ca²⁺-ATPase activity recovery is mostly manifested in the cells, incubated with cryoprotectant at 0-4°C. As shown in the researches accomplished [4] the temperature may modulate the PEO-1500 interaction with biological membranes. Under temperature decrease the PEO-1500 amount, forming quite the tight bonds with membranes reduces. Therefore when diluting erythrocyte suspension with physiological solution the amount of residual PEO-1500 in membranes will be lower under cell exposure with cryoprotectant at 0-4°C compared to 37°C incubation. Evidently, this contributes to better recovery of structural and functional membrane parameters. The reversibility of PEO-1500 inhibiting effect on a erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity enables assuming this functional system to be able of normal functioning after transfusion, that is necessary to maintain and regulate Ca²⁺ intracellular concentration.

Changes in erythrocyte Ca²⁺-ATPase activity play an important role in regulating different metabolic

влиянием ПЭО-1500, по-видимому, является основным физиологическим механизмом повышения его внутриклеточного уровня. Увеличение концентрации Ca^{2+} в эритроцитах, вызванное ингибированием Ca^{2+} -АТФазы, дополняется осмотическими эффектами раствора ПЭО-1500, вызывающего дегидратацию клеток и концентрирование всех внутриклеточных компонентов. Повышение уровня Ca^{2+} в данных условиях может вызвать регуляторные изменения структурного и функционального состояния ряда субклеточных систем. Последствия роста уровня внутриклеточного Ca^{2+} , по-видимому, неоднозначны для клеток на разных этапах криоконсервирования. Увеличение механической прочности мембраны, индуцированное ростом концентрации Ca^{2+} в эритроцитах [15], возможно, повышает их устойчивость к замораживанию-отогреву. Однако перенос клеток в физиологические условия может активировать Ca^{2+} -зависимые процессы, ведущие к структурно-функциональным нарушениям.

Механизм ингибирующего воздействия ПЭО-1500 на Ca^{2+} -АТФазу в структуре плазматической мембраны эритроцитов представляется весьма непростым, поскольку действие данного вещества на клетку затрагивает целый ряд параметров ее структурного состояния. Молекулы ПЭО-1500 образуют водородные связи с различными структурами [6, 9, 16]. При взаимодействии ПЭО с гидратными оболочками макромолекул, составляющих плазматическую мембрану, полимер может образовывать покров вокруг клетки и ограничивать доступность молекул воды к той части Ca^{2+} -АТФазы, которая экспонирована на внешнюю поверхность. Кроме того, адсорбируясь на плазматической мембране, ПЭО-1500 может нарушать структуру гидратной оболочки поверхностных частей Ca^{2+} -АТФазы, вступая во взаимодействие с полярными группировками макромолекулы, что затрудняет конформационные превращения фермента в ходе каталитической реакции.

Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы может быть также следствием модификации липидной фазы мембраны в присутствии ПЭО-1500. Известна способность молекул ПЭО и ПЭГ с различными молекулярными массами вызывать агрегацию и слияние биологических мембран и липосом [3, 16], что связывают с участием данных соединений в образовании водородных связей с молекулами воды, сольватирующими полярные головки фосфолипидов. Взаимодействие ПЭГ с мембранами вызывает модификацию физических параметров бислоя, в частности, увеличивается текучесть липидов, изменяются энтропия, энтальпия и кооперативность фазовых переходов [16]. Отмечено возникновение полиморфных превращений в ли-

processes [13, 17] and inducing certain balance of structural and functional state of subcellular systems under changed conditions of cell vital activity. The alterations in erythrocytes of patients with hypertension may be such an example [14]. The investigations demonstrated that the Ca^{2+} -ATPase activity of saponin-permeabilised erythrocytes was maintained after ultra low temperature effect that testified to its cryostability. However applying cryoprotectants for cell protection under freeze-thawing affects the Ca-pump catalytic activity. PEO-1500 exocellular cryoprotectant modifies parameters either of extra- or intracellular media due to its osmotic activity and adsorption capability [6]. Ca^{2+} -ATPase activity and intracellular calcium level alterations under these conditions can play a certain role in the regulation of erythrocyte metabolism. Since the Ca^{2+} ions in extracellular medium are in a residual amount, the inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity in erythrocytes under PEO-1500 effect is apparently the main physiological mechanism of its intracellular level augmentation. Increase in Ca^{2+} concentration in erythrocytes, caused by Ca^{2+} -ATPase inhibition is complemented by osmotic effects of PEO-1500 solution, causing cell dehydration and concentrating all intracellular components. Augmentation of Ca^{2+} level under these conditions may cause regulatory changes in structural and functional state of some subcellular systems. Consequences of elevated intracellular Ca^{2+} level are not apparently uniform for cells at different cryopreservation stages. Increase in mechanical stability, induced by Ca^{2+} concentration increase in erythrocytes [15] possibly improves their resistance to freeze-thawing. However cell transfer into physiological conditions may activate Ca^{2+} -dependent processes, resulting in structural and functional disorders.

Mechanism of PEO-1500 inhibiting effect on Ca^{2+} -ATPase in erythrocyte plasma membrane structure appears to be quite intricate, because this substance affects a number of parameters of cell structure. PEO-1500 molecules form hydrogen bonds with different structures [6, 9, 16]. Under PEO interaction with macromolecule hydrate coat, composing a plasma membrane, the polymer may form the cover around of cell and limit water molecule availability to that part of Ca^{2+} -ATPase, which is exposed to an external surface. In addition, being absorbed on plasmatic membrane PEO-1500 may impair the structure of hydrate coat of Ca^{2+} -ATPase surface parts, by interacting with polar groups of the macromolecule, that complicates the conformational enzyme transformations during catalytic reaction.

Change in Ca^{2+} -ATPase activity may also result from membrane lipid phase modification at PEO-1500 presence. The capability of PEO and PEG molecules with different molecular mass values is known to cause

пидной фазе, связанных с нарушением бислоидной ламеллярной структуры [3, 12]. Таким образом, изменения структурных свойств липидного бислоид мембраны и, возможно, зарядовых характеристик микроокружения Ca^{2+} -АТРаза под влиянием ПЭО-1500 может быть одной из причин торможения работы данной ферментативной системы.

Поскольку ПЭО-1500 влияет на различные свойства плазматических мембран, то логично предположить, что его ингибирующее влияние на Ca^{2+} -АТРаза эритроцитов является суммирующим результатом модификации всех физико-химических характеристик мембраны под влиянием данного криопротектора.

Обнаруженное нами изменение Ca^{2+} -АТРазной активности в эритроцитах под влиянием ПЭО-1500 ставит вопрос о механизме ее ингибирования и требует проведения оценки кинетических характеристик функционирования данной системы, ее чувствительности к регуляторным воздействиям разных концентраций Ca^{2+} , анализа Ca^{2+} транспортирующей способности в этих условиях. Ответы на эти вопросы позволят в перспективе представить роль Ca^{2+} -регулирующих систем в изменениях структурно-функционального состояния клеток при изучении механизмов их стабилизации к действию стрессовых факторов низкотемпературного воздействия при использовании экзоцеллюлярных криопротекторов.

Выводы

1. Экзоцеллюлярный криопротектор ПЭО-1500 ингибирует активности Ca^{2+} -АТРаза эритроцитов при инкубировании с ним клеток, а последующий цикл замораживания-отогрева ($-196...37^\circ\text{C}$) в его присутствии не влияет на установившийся режим работы данного фермента.

2. Ингибирование, вызванное действием ПЭО-1500, носит обратимый характер и активность Ca^{2+} -АТРаза эритроцитов восстанавливается после его разведения в клеточной суспензии, что необходимо для нормального функционирования криоконсервированных клеток в русле крови после трансфузии.

Литература

1. *Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г.* Влияние температуры и криопротектора ПЭО-1500 на характер модификации белков цитоскелета и устойчивость эритроцитов в процессе криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 1994.– №2.– С. 7-11.
2. *Болдырев А.А.* Биологические мембраны и транспорт ионов.– М., 1985. – 208 с.
3. *Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М.* Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка. – 1988. – 208 с.

aggregation and fusion of biological membranes and liposomes [3, 16], that is associated to the participation of these compounds in formation of hydrogen bonds with water molecules, solvating polar heads of phospholipids. PEG interaction with membranes causes the modification of bilayer physical parameters, in particular, there is an increase in lipid fluidity, changes in entropy, enthalpy and cooperativity of phase transitions [16]. The appearance of polymorphous transformations in lipid phase, associated to a disorder in bilayer lamellar structure was noted [3, 12]. Thus, the changes in structural properties of membrane lipid bilayer and probably the charge characteristics of Ca^{2+} -ATPase microenvironments may be one of the causes of inhibiting activity of this enzyme system.

Since PEO-1500 affects different properties of plasma membranes, it is logic to suppose that its inhibiting effect on erythrocyte Ca^{2+} -ATPase is a summarising result of modification of all physical and chemical membrane characteristics under this cryoprotectant effect.

Revealed by us change in erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity under PEO-1500 effect arises a question about the mechanism of its inhibition and requires performing estimation of kinetic characteristics of this system functioning, its sensitivity to regulatory effects of different Ca^{2+} concentrations, analysis of Ca^{2+} transporting ability under these conditions. Answers on these questions will enable in future to imagine the role of Ca^{2+} -regulating systems in changing structural and functional state of cells when studying the mechanisms of their stabilisation to the effect of stress factors of low temperature effect when using exocellular cryoprotectants.

Conclusions

1. PEO-1500 exocellular cryoprotectant inhibits the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity under cell incubation with it, but a following cycle of freeze-thawing ($-196\div 37^\circ\text{C}$) at its presence does not affect the settled functioning regimen of this enzyme.

2. Inhibition, caused by PEO-1500 effect has a reversible character and erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity recovers after its dilution in cell suspension, that is necessary for normal functioning of cryopreserved cells in blood bed after transfusion.

References

1. *Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* Effect of temperature and PEO-1500 cryoprotectant on the nature of cytoskeletal protein modification and red blood cell stability during cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1994.– N2.– P. 7-11.
2. *Boldyrev A.A.* Biological membranes and ion transport.– Moscow: Moscow State University, 1985.– 208 p.

4. Землянских Н.Г., Белоус А.М. Взаимодействие ПЭО с плазматической мембраной эритроцитов после охлаждения и замораживания // Доп. НАН України.– 1995.– №3.– С.119-121.
5. Кузьмина Л.Н. Криочувствительность системы транспорта кальция мембран саркоплазматического ретикулума мышц кролика в процессе развития: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1991– 16 с.
6. Новиков А.Н., Липина О.В., Олейник С.Т. Адсорбционная активность этиленгликоля и криопротекторная активность ряда ПЭО // Криобиология и криомедицина.– 1983.– №13.– С. 39-42.
7. Орлов С.Н. Кальмодулин // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии.– 1987.– Т. 8.– 204 с.
8. Покудин Н.И., Петруняк В.В., Орлов С.Н. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах *in vivo*? // Биохимия.– 1988.– Т. 53, №5.– С. 753-758.
9. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
10. Рыбина В.В., Еленская И.А., Каймачников Н.П. Регуляция активности Са²⁺-АТФазы ионами Са²⁺ и кальмодулином в эритроцитах человека при различном времени хранения // Биол. мембраны.– 2001.– Т. 18, №4.– С. 287-293.
11. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация.– М.: Мир, 1988.– 586 с.
12. Boni L.T., Stewart T.P., Alderfer J.L., Hui S.W. Lipid-polyethylene glycol interactions: II. Formation of defects in bilayer // J. Membrane Biol.– 1981.– Vol. 62, N1-2.– P. 71-77.
13. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2002.– Vol. 99, N3.– P. 1115-1122.
14. Fu Y., Wang S., Lu Z. *et al.* Erythrocyte plasma Ca²⁺, Mg²⁺ and cell membrane adenosin triphosphatase activity in patients with essential hypertension // Chin. Med. J. (Engl.).–1998.– Vol. 111, N2.– P. 147-149.
15. Liu F., Mizukami H., Sarnaik S., Ostafin A.J. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy // J. Struct. Biol.– 2005. – Vol. 150, N2. – P. 200-210.
16. 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.– P. 356-362.
17. Penniston J.T., Enyedi A. Modulation of the plasma calcium pump // J. Membr. Biol.– 1998.– Vol. 165, N2.– P. 101-109.
18. Rathbun W., Betlarch V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosin triphosphate // Anal. Biochem.– 1969.– Vol. 28, N1.– P. 436-445.
19. Romero P.J., Romero E.A. Effect of cell aging on Ca²⁺ influx into human red cells // Cell Calcium.–1999.– Vol. 26, N3-4.– P. 131-137.
20. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma calcium pumps// Physiol. Rev.– 2001.– Vol. 81, N1.– P. 21-50.
21. Zhegunov G.F., Belous A.M. The effect of cryoprotectants on the structure and function of Ca-transport system in sarcoplasmic reticulum membranes // Cryoletters.– 1980.– Vol. 1, N13.– P. 461-470.
3. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes under low temperatures.– Kiev: Naukova Dumka.– 1988.– 208 p.
4. Zemlyanskikh N.G., Belous A.M. PEO interaction with erythrocyte plasmatic membrane after cooling and freezing // Dopovidi NAN Ukrainy.– 1995.– N3.– P. 119-121.
5. Kuzmina L.N. Cryosensitivity of calcium transport system of sarcoplasmic reticulum membranes of rabbit muscles during development: Authors' abstract of thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 1991.– 16p.
6. Novikov A.N., Lipina O.V., Olejnik S.T. Adsorption activity of ethylene glycol and cryoprotective activity of PEO series // Kriobiologiya i Kriomeditsina.– 1983.– N13.– P. 39-42.
7. Orlov S.N. Calmodulin // Itogi Nauki i Tekhniki. Common problems of physical and chemical biology.– 1987, Vol. 8.– 204 p.
8. Pokudin N.I., Petrunyaka V.V., Orlov S.N. Does calmodulin participate in regulating Ca-pump activity in erythrocytes *in vivo*? // Biokhimiya.– 1988.– Vol. 53, N5.– P. 753-758.
9. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. Cryoprotectants.– Kiev: Naukova Dumka.– 1978.– 204 p.
10. Rybina V.V., Elenskaya I.A., Kajmachnikov N.P. Regulation of Ca²⁺-ATPase activity with Ca²⁺ ions and calmodulin in human erythrocytes under various storage time // Biol. membrany.– 2001.– Vol. 18, N4.– P. 287-293.
11. Hochachka P., Somero J. Biochemical adaptation.– Moscow: Mir, 1988.– 586 p.
12. Boni L.T., Stewart T.P., Alderfer J.L., Hui S.W. Lipid-polyethylene glycol interactions: II. Formation of defects in bilayer // J. Membrane Biol.– 1981.– Vol. 62, N1-2.– P. 71-77.
13. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2002.– Vol. 99, N3.– P. 1115-1122.
14. Fu Y., Wang S., Lu Z. *et al.* Erythrocyte plasma Ca²⁺, Mg²⁺ and cell membrane adenosin triphosphatase activity in patients with essential hypertension // Chin. Med. J. (Engl.).–1998.– Vol. 111, N2.– P. 147-149.
15. Liu F., Mizukami H., Sarnaik S., Ostafin A.J. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy // J. Struct. Biol.– 2005. – Vol. 150, N2. – P. 200-210.
16. 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.– P. 356-362.
17. Penniston J.T., Enyedi A. Modulation of the plasma calcium pump // J. Membr. Biol.– 1998.– Vol. 165, N2.– P. 101-109.
18. Rathbun W., Betlarch V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cystein and adenosin triphosphate // Anal. Biochem.– 1969.– Vol. 28, N1.– P. 436-445.
19. Romero P.J., Romero E.A. Effect of cell aging on Ca²⁺ influx into human red cells // Cell Calcium.–1999.– Vol. 26, N3-4.– P. 131-137.
20. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma calcium pumps// Physiol. Rev.– 2001.– Vol. 81, N1.– P. 21-50.
21. Zhegunov G.F., Belous A.M. The effect of cryoprotectants on the structure and function of Ca-transport system in sarcoplasmic reticulum membranes // Cryoletters.– 1980.– Vol. 1, N13.– P. 461-470.

Поступила 21.04.2006

Accepted in 21.04.2006