

Влияние глицерола на активность Ca^{2+} -АТФазы и асимметричное распределение липидов в мембране эритроцитов человека

О.А. КОФАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Glycerol Effect on Ca^{2+} -ATPase Activity and Asymmetric Lipid Distribution in Human Erythrocyte Membrane

O.A. KOFANOVA

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

Изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} играет важную роль в регуляции структурно-функционального состояния различных субклеточных систем. В эритроцитах человека Ca^{2+} -АТФаза является единственной структурой, осуществляющей транспорт Ca^{2+} против градиента концентрации. Поскольку при криоконсервировании эритроцитов человека наиболее часто используется глицерол, то изучение его влияния на структуру плазматической мембраны и функциональную активность Ca^{2+} -АТФазы необходимо для понимания механизмов стабилизации клеток к действию стрессовых факторов.

Цель данной работы – изучение влияния глицерола на каталитическую активность Ca^{2+} -насоса и асимметричное распределение фосфатидилсерина (ФС) в мембранах эритроцитов человека.

Установлено, что увеличение содержания криопротектора в среде вызывает концентрационно-зависимое изменение активности Ca^{2+} -АТФазы. При использовании различных модельных систем (сапонин-пермеабилizированных клеток и белых теней) были выявлены особенности модификации глицеролом каталитической активности Ca^{2+} -насоса, связанные с участием регуляторных эндогенных модуляторов. В белых тенях Ca^{2+} -АТФазная активность постепенно снижается при увеличении концентрации глицерола. В сапонин-пермеабилizированных клетках изменение активности Ca^{2+} -насоса в присутствии криопротектора имеет бифазный характер с максимумом активности при 10%-м глицероле. Применение ингибитора кальмодулин-зависимых реакций R24571 позволило установить, что активация глицеролом Ca^{2+} -АТФазы возможна только при участии кальмодулина. В обеих моделях при использовании криопротекторных концентраций глицерола отмечено снижение активности Ca^{2+} -насоса на 20-30% по сравнению с контролем, что приводит к повышению уровня внутриклеточного Ca^{2+} и может вызвать негативные последствия. Активация скремблазы при повышении содержания Ca^{2+} разрушает асимметрию плазматической мембраны и ведет к экстернализации ФС. Воздействие глицерола на перераспределение ФС в мембране, оцененное по связыванию аннексина V-FITC с эритроцитами, показало, что достаточно продолжительный контакт клеток с криопротектором не оказывает заметного влияния на экспонирование ФС на внешнюю поверхность мембраны. Следовательно, увеличение уровня Ca^{2+} , вызванное ингибированием активности Ca^{2+} -АТФазы под влиянием глицерола, не оказывает негативного влияния на структуру липидного бислоя.

Таким образом, глицерол может оказывать криопротекторное действие не только вследствие изменения свойств раствора, но и его способности модифицировать биохимические процессы в клетке, способствуя их стабилизации в стрессовых условиях.

Change in concentration of intracellular Ca^{2+} plays an important role in regulating structural and functional state of different subcellular systems. In human erythrocytes Ca^{2+} -ATPase is the only structure, realising Ca^{2+} transport against concentration gradient. Since glycerol is the most applied in cryopreservation of human erythrocytes, studying its effect on plasmatic membrane structure and Ca^{2+} -ATPase functional activity is necessary for understanding mechanisms of cell stabilisation to stress factors.

This research was aimed to study glycerol effect on Ca^{2+} -pump catalytic activity and asymmetric distribution of phosphatidyl serine (PS) in human erythrocyte membranes.

The augmentation of cryoprotectant content in the medium was established to cause a concentration-dependent change in Ca^{2+} -ATPase activity. When using different model systems (saponin-permeabilised cells and white ghosts) there were revealed the peculiarities of Ca^{2+} -pump catalytic activity modification with glycerol, associated to the participation of regulatory endogenous modulators. In white ghosts the Ca^{2+} -ATPase activity gradually reduces with augmenting glycerol concentration. In saponin-permeabilised cells a change in Ca^{2+} -pump activity at cryoprotectant presence is of biphasic character with the maximum activity under 10% glycerol. The applying of inhibitor of calmodulin-dependent reactions R24571 enables to establish that Ca^{2+} -ATPase activation with glycerol was possible only with calmodulin participation. A decrease in Ca^{2+} -pump activity by 20-30% in comparison with the control was noted in both models when using cryoprotective concentrations of glycerol, that inevitably increased the level of intracellular Ca^{2+} and could cause negative consequences. Scramblase activation under Ca^{2+} increase destroys plasmatic membrane asymmetry and results in PS externalisation. Glycerol effect on PS redistribution in a membrane, assessed by annexin V-FITC binding with erythrocytes demonstrated that quite a long cell contact with cryoprotectant did not significantly affect PS exposure onto external membrane surface. Consequently, Ca^{2+} level augmentation, caused by inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity under glycerol effect does not negatively affect the structure of lipid bilayer.

Thus, glycerol can cause a cryoprotective effect not only due to a change in solution properties, but its capability to modify biochemical processes in cell, by contributing their stabilisation under stress conditions.