

## Модификация активности $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов под влиянием глицерола, замораживания и в средах с различной ионной силой

Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ, О.А. КОФАНОВА, Л.А. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Modification of Erythrocytes' $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Activity under Glycerol and Freezing Effect and in Media with Different Ionic Strength

N.G. ZEMLYANSKIKH, O.A. KOFANOVA, L.A. BABIICHUK

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

Изменение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов в критические моменты жизнедеятельности клеток, в том числе при криоконсервировании, может играть важную роль в сохранении их структурной целостности и функциональной полноценности. Эндоцеллюлярный криопротектор глицерол способен концентрационно-зависимым способом модифицировать работу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. На модели сапонин-перфорированных клеток было показано, что небольшие концентрации глицерола стимулируют ферментативную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, а высокие – тормозят скорость АТФазной реакции. Активирующее действие глицерола в отношении  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы может быть связано как с вовлечением ее эндогенных регуляторов, так и с модифицирующим влиянием параметров среды в контроле функциональной активности данной ионтранспортирующей системы. Отмечено, что активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы может изменяться под влиянием низких температур при консервировании эритроцитов под защитой глицерола, а также в результате деглицеринизации деконсервированных клеток.

**Ключевые слова:** эритроциты, криоконсервирование, глицерол,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза.

Зміна активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз еритроцитів у критичні моменти життєдіяльності клітин, у тому числі при криоконсервуванні, може відігравати важливу роль у збереженні їхньої структурної цілісності і функціональної повноцінності. Ендоцелюлярний криопротектор гліцерол здатний концентраційно-залежним способом модифікувати роботу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз. На моделі сапонін-перфорованих клітин було показано, що невеликі концентрації гліцеролу стимулюють ферментативну активність  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, а високі – гальмують швидкість АТФ-азної реакції. Активуюча дія гліцеролу у відношенні до  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз може бути пов'язана як із залученням її ендогенних регуляторів, так і з впливом модифікуючих параметрів середовища в контролюванні функціональної активності даної іонтранспортуєчої системи. Зазначено, що активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз може змінюватися під впливом низьких температур при консервуванні еритроцитів під захистом гліцеролу, а також у результаті дегліцеринізації деконсервованих клітин.

**Ключові слова:** еритроцити, криоконсервування, гліцерол,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза.

The change in erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in critical moments of cell life, including cryopreservation, can play an important role in preserving their structural and functional integrity. Endocellular cryoprotectant glycerol is capable to modify the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity by concentration-dependent way. Using the saponin-perforated cells as a model the low concentrations of glycerol were demonstrated to stimulate the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-pump enzymatic activity, while the high ones inhibited the rate of ATPase reaction. An activating effect of glycerol in respect of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase can be related to both the involvement of its endogenous regulators and a modifying effect of medium parameters in controlling this ion-transporting system functional activity. The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was noted to be changed under low temperature effect during erythrocyte preservation with glycerol protection, as well as a result of frozen-thawed cell deglycerolisation.

**Key-words:** erythrocytes, cryopreservation, glycerol,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Несмотря на усилия ученых многих стран, попытки создания высокотехнологичных способов криоконсервирования эритроцитов, базирующихся на применении экзоцеллюлярных криопротекторов, до настоящего момента не увенчались успехом. Привлекательность таких криопротекторов, как HES, PEG, PVP основана на возможности их использования в безотмывочных технологиях [1, 13, 15]. Однако нестабильность клеток, криоконсервированных под их защитой, в физиологических условиях не оставляет альтернативы

In spite of the efforts of many foreign scientists the attempts on creating the highly technological ways for erythrocyte cryopreservation, based on the application of exocellular cryoprotectants, have not succeeded till now. The attractiveness of such cryoprotectants as HES, PEG, PVP is based on the possibility of their usage without washing-out techniques [1, 13, 15]. However the instability of cells, cryopreserved under their protection within a long-term period does not keep a choice for glycerol application as the main cryoprotectant in cryobanks practice in

**Адрес для корреспонденции:** Землянских Н.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Zemlyanskikh N.G., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

применению глицерола как основного криопротектора в практике криобанков разных стран. Глицерол используется в различных методах криоконсервирования эритроцитов [9,10,16], обеспечивает высокую степень сохранности клеток, которые обладают стабильностью и физиологической полноценностью, что позволяет им выполнять свои функции в русле крови при трансфузии.

Исследование механизмов, обеспечивающих сохранность клеток под защитой глицерола при криоконсервировании, заслуживает особого внимания, поскольку может быть инструментом целенаправленной модификации метаболизма клеток, повышающей их стабильность к стрессовым воздействиям при разработке новых способов криоконсервирования эритроцитов.

Влияние глицерола на системы мембранного транспорта имеет решающее значение для выживания клеток в стрессовых условиях. Легко проникая в клетки, он изменяет не только параметры внешней среды, но и свойства внутриклеточного содержимого. Несомненно, часть молекул криопротектора может находиться и в структуре плазматической мембраны. Для эритроцитов, представляющих крайне дифференцированные клетки, свойства мембраны и особый режим функционирования транспортных и сигнальных систем на разных этапах криоконсервирования, являются, по-видимому, наиболее существенными факторами для стабилизации клеток при замораживании-отогреве. Биохимический аспект модификации метаболизма и структуры клеток под влиянием криопротекторов и других неспецифических факторов, сопутствующих замораживанию-отогреву, представляется не менее важной стороной стабилизации клеток, чем физико-химические изменения среды в процессе криоконсервирования.

Цель исследования – изучение изменений активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов человека под влиянием различных концентраций глицерола, солей одновалентных катионов и процесса замораживания-отогрева под защитой данного криопротектора.

### Материалы и методы

В работе использовали донорскую кровь (А(II) группа, мужчины), заготовленную на консерванте “Глюгидир” со сроком хранения 3-5 суток при 4°C. Эритроциты отделяли от плазмы и компонентов лейкоцитарной массы центрифугированием при 3000 об/мин на центрифуге ОПН-3. Эритромассу трижды промывали раствором А (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4) в соотношении объемов 1:4, каждый раз удаляя верхний слой клеток, содержащий компоненты белой крови.

different countries. Glycerol is used in different methods of erythrocyte cryopreservation [9, 10, 16] and provides a high preservation rate for stable and physiologically integral cells, that enables them to perform their functions in blood channel during transfusion.

The investigation of mechanisms, providing cell integrity under glycerol protection during cryopreservation is of special attention, since it can be an instrument for the aimed modification of cell metabolism, increasing their stability to stress effects, as well as when elaborating the new ways for erythrocyte cryopreservation.

Glycerol effect on membrane transport systems is decisive for cell survival under stress. Due to an easy penetration into cells it changes not only the environment parameters but the properties of intracellular content as well. Evidently, a part of cryoprotectant molecules may be located in plasmatic membrane structure too. For the erythrocytes, which are the extremely differentiated cells, the membrane properties and a special regimen for the transport and signalling systems' functioning at different stages of cryopreservation are, apparently, the most significant factors of cell stabilisation under freeze-thawing. Biochemical aspect of metabolism and cell structure modification under the effect of cryoprotectants and some other non-specific factors, accompanying freeze-thawing, is also an important side of cell stabilisation as physical and chemical changes in the medium during cryopreservation.

The research was aimed to study the change in  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity in human erythrocytes under the effect of different concentrations of glycerol, monovalent cation salts and freeze-thawing process using this cryoprotectant.

### Materials and methods

Donor's blood (A(II) group, men), procured with “Glygicir” preservative with storage term of 3-5 days at 4°C was used in the research. Erythrocytes were separated from plasm and white cell components using centrifugation at 3000 rot/min with OPN-3 centrifuge. The erythromass was thrice washed-out with A solution (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) in 1:4 volume ratio, with every time removing an upper cell layer, containing white blood components.

In order to determine the  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity [5] the erythrocytes' aliquots were introduced into the medium B (0.04% saponin, 1 mM ATP, 1 mM EGTA, 0.025 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris, 10 mM HEPES, 135 mM KCl and 1.1 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.4)). The  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity was estimated by the difference of inorganic phosphate accumulation in  $\text{Ca}^{2+}$ -containing samples and parallel  $\text{Ca}^{2+}$ -free samples. Depending on specific experimental tasks the medium composition was varied by additional introducing different

Для определения  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности [5] алиquotы эритроцитов вносили в среду В (0,04% сапонина, 1 мМ АТФ, 1 мМ EGTA, 0,025 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ Трис, 10 мМ HEPES, 135 мМ KCl и 1,1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4). Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы оценивали по разнице накопления неорганического фосфата в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащих пробах и параллельных  $\text{Ca}^{2+}$ -несодержащих пробах. В зависимости от конкретных экспериментальных задач состав среды варьировали, вводя дополнительно разные концентрации глицерола (5-60%); NaCl (150-600 мМ); KCl (150-600 мМ). При оценке  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности в средах, содержащих NaCl, работу  $\text{Na}^+$ -насоса блокировали добавлением 1 мМ оубаина. Реакцию ферментативного гидролиза АТФ отслеживали, инкубируя клетки при 37°C в течение 20 мин. После чего реакцию останавливали, добавляя холодный раствор ТХУ до конечной концентрации 5%. Уровень неорганического фосфора ( $\text{P}_i$ ) в пробах определяли по методу, описанному в [11].

Удельную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов рассчитывали на  $10^9$  клеток. Подсчет клеток в пробах проводили в камере Горяева.

Для оценки влияния процессов криоконсервирования на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазную активность эритроцитов были проведены эксперименты по замораживанию клеток в жидком азоте. Для этого к эритроmasse добавляли равный объем раствора С (30% глицерола, 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,4) и инкубировали в течение 20 мин, после чего клетки в металлических контейнерах (объемом 10 мл) погружали в жидкий азот. Размораживали на водяной бане с температурой 42°C при постоянном покачивании. Деконсервированные клетки были разделены на 2 части. Клетки первой части осаждали центрифугированием при 3000 об/мин и алиquotы эритроmasсы переносили в среду В для проведения ферментативной реакции. Параллельно оценивали количество клеток в пробе и уровень гемолиза. Другую часть деконсервированной эритроmasсы использовали при деглицеринизации для оценки  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности эритроцитов, возвращенных после криоконсервирования в нормальные физиологические условия. Деглицеринизацию выполняли по схеме: 1-й этап – осажждение клеток и удаление надосадка; 2-й этап – отмывание эритроmasсы равным объемом 600 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСl (pH 7,4); 3- и 4-й этапы – отмывание равными объемами среды А. После завершения отмывочных процедур алиquotы эритроmasсы вносили в среду В и определяли активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов, как описано выше. Параллельно оценивали количество клеток в пробе и уровень гемолиза.

concentrations of glycerol (5-60%); NaCl (150-600 mM) and KCl (150-600 mM). When estimating  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in NaCl-containing media the  $\text{Na}^+$ -pump work was blocked by adding 1 mM ouabain. The reaction of ATP enzymatic hydrolysis was traced by incubating cells at 37°C within 20 min, then the reaction was stopped by adding cold TCA solution up to 5% final concentration. The level of inorganic phosphorus ( $\text{P}_i$ ) in samples was determined by the described method [11].

The erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase specific activity was calculated per  $10^9$  cells. Cell counting in samples was carried-out in Goryaev's chamber.

In order to estimate the cryopreservation effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erythrocyte activity the experiments on cell freezing in liquid nitrogen were carried-out. For this purpose the equal volume of C solution (30% glycerol, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) was added to erythrocyte mass and incubated for 20 min, then cells in metal containers (10 ml volume) were immersed into liquid nitrogen, frozen-thawed on water bath of 42°C temperature with a constant shaking. Frozen-thawed cells were divided into 2 parts. Cells of the first part were precipitated by centrifuging at 3000 rot/min and erythrocyte mass aliquots were transferred into the medium B for the enzyme reaction performance. Simultaneously there were evaluated the cell number in a sample and hemolysis level. Another part of frozen-thawed erythrocyte mass was used during deglycerolisation for estimating  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of erythrocytes, returned after cryopreservation under normal physiological conditions. Deglycerolisation was performed according to the protocol: 1<sup>st</sup> stage is cell precipitation and supernatant removal; 2<sup>nd</sup> stage is erythrocyte mass washing-out with equal volume of 600 mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4); 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> stages are washing-out with equal volumes of the medium A. After completing the washing-out procedures the erythrocyte mass aliquots were introduced into the medium B and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erythrocyte activity was determined as described above. At the same time we estimated the amount of cells in a sample and the hemolysis level.

## Results and discussion

Unique role of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in erythrocytes is explained by the fact, that it is the only system in a cell, controlling the level of cytosol calcium. In addition, it is devoted not only to support a 10,000-fold  $\text{Ca}^{2+}$  gradient on a membrane under stationary conditions of cell vital activity, but the regulation at a receptor-induced increase in its concentration under external signal effect. The change in catalytic properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump and, consequently its capability to translocate the  $\text{Ca}^{2+}$  ions in erythrocytes at different cryopreservation stages can cause a considerable effect

## Результаты и обсуждение

Уникальная роль  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в эритроцитах объясняется тем, что это единственная система в клетке, обеспечивающая контроль за уровнем цитозольного кальция. Кроме того, она призвана не только поддерживать 10 000-кратный градиент  $\text{Ca}^{2+}$  на мембране в стационарных условиях жизнедеятельности клетки, но и осуществлять регуляцию при рецептор-индуцированном повышении его концентрации под воздействием внешнего сигнала. Изменение каталитических свойств  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, следовательно, и его способности транслоцировать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в эритроцитах на разных этапах криоконсервирования может оказать значительное влияние на жизнеспособность эритроцитов. Учитывая, что при инкубации с глицеролом происходит насыщение эритроцитов криопротектором, и его концентрация внутри клетки постепенно нарастает, транспортные системы плазматической мембраны в начальный период и после достижения равновесного состояния могут по-разному реагировать на происходящие изменения параметров среды. Динамику насыщения глицеролом и изменение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в ходе этого процесса можно смоделировать исследованием функционирования фермента в средах с разными концентрациями криопротектора.

На рис.1 представлена активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в сапонин-перфорированных эритроцитах при изменении уровня глицерола в среде. Видно, что эта зависимость носит бифазный характер.  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазная активность растет при небольших концентрациях глицерола, достигая максимальных значений при 10%-м содержании криопротектора в среде. После этого активирующее влияние глицерола на работу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов начинает снижаться. Но только в условиях, когда его уровень превышает 20%-ю концентрацию, отмечается достоверное снижение каталитической активности ниже контрольных значений. При дальнейшем повышении концентрации криопротектора происходит медленное снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы.

Повышение каталитической активности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса эритроцитов под влиянием глицерола при концентрациях, соответствующих начальному этапу насыщения клеток криопротектором, может играть важную роль в стабилизации клеток. В этих условиях потенциально возможно увеличение скорости входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку вследствие пертурбации в структуре плазматической мембраны, вызванной глицеролом. И если в это же время отмечается активация работы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, то увеличение скорости входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку будет скомпенсировано ростом  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активнос-

on erythrocyte viability. Taking into account the fact, that during incubation with glycerol the erythrocyte saturation with cryoprotectant occurs and its concentration inside a cell gradually increases, the transport systems of plasmatic membrane in an initial period and after achieving a balanced state can differently respond to the occurring changes in medium parameters. The dynamics of saturation with glycerol and a change in  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity during this process can be modelled by studying the enzyme functioning into the media with different cryoprotectant concentrations.

Fig. 1 demonstrates the  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity in saponin-perforated erythrocytes at the glycerol level change in the medium. It appears that this dependency is a biphasic character. The  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity increases under low glycerol concentrations by achieving the maximum values at 10% cryoprotectant content in the medium. Afterwards an activating effect of glycerol on the erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity starts to reduce. But only when its level exceeds 20% concentration a statistically significant decrease in catalytic activity lower than the control values is observed. During following increase in cryoprotectant concentration a slow decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе activity occurs.

An increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -pump catalytic activity of erythrocytes under glycerol effect at the concentrations, corresponding to initial state of cell saturation with a cryoprotectant, can play an important role in cell stabilisation process. Under these conditions the augmentation of  $\text{Ca}^{2+}$  entrance rate into a cell is

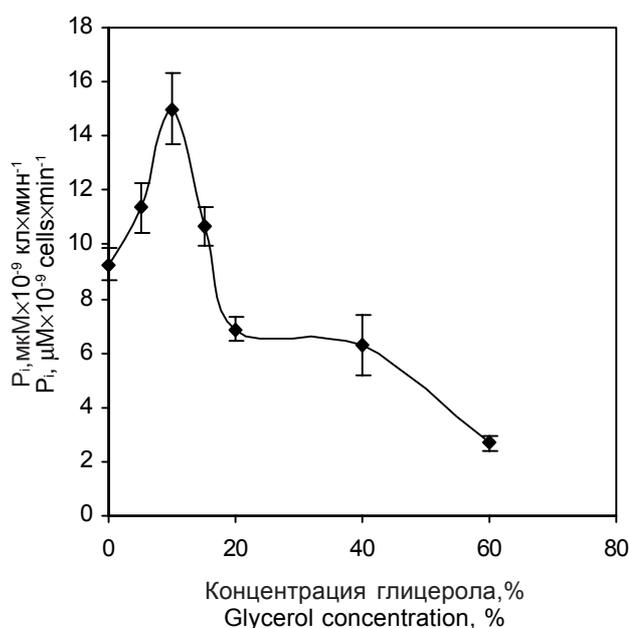


Рис.1. Влияние глицерола на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов.

Fig.1. Glycerol effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе erythrocyte activity.

ти, направленной на восстановление определенного баланса между этими встречными потоками катиона через мембрану. Дальнейшее торможение скорости работы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы примерно на 20-25% при увеличении концентрации глицерола в среде, очевидно, не может значительно повлиять на рост внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  на фоне предшествующих изменений. Таким образом, следует ожидать, что перед криоконсервированием уровень цитозольного кальция, если и повышается, то все же не выходит резко за рамки физиологических диапазонов. Тем самым, биохимическая модификация и изменение физико-химических параметров среды под влиянием глицерола, по-видимому, способствуют стабилизации эритроцитов в процессе замораживания-отогрева.

Следует отметить, что установленные нами закономерности не вполне согласуются с ранее полученными результатами [2]. При оценке удельной АТФазной активности расчет проводился на 1 л эритроцитов или реставрированных теней эритроцитов. Этот расчет представляется не совсем верным, поскольку он не учитывает изменения объема клеток при инкубации с глицеролом, в результате чего в единице объема крови, отобранной для измерения исследуемых характеристик, окажется меньше функциональных единиц. Проведенные исследования (таблица) показывают изменения ряда параметров после инкубации эритроцитов с глицеролом. Эти данные подтверждают необходимость применения иного способа расчета удельной активности, основу которого составляет количество клеток в пробе.

Кроме того, различия между нашими данными и результатами, представленными в работе [2], могут быть связаны с использованием иной модельной системы (сапонин-перфорированных эритроцитов) [5], что позволяет сохранить в среде ферментативного гидролиза все эндогенные регуляторы, влияющие на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Тем самым создаются условия для вовлечения эндогенных модуляторов в регуляцию активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы при изменении параметров среды. Необходимость учета особенностей модельной системы при оценке полученных результатов в ходе исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов [3] позволяет избежать неприемлемых противоречий при сопоставлении данных различных работ.

Активирующее влияние глицерола на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу было продемонстрировано при гидролизе псевдосубстрата – Р-нитрофенилфосфата [8]. Авторы показали, что в присутствии глицерола  $\text{Ca}^{2+}$  сильно стимулирует фосфатазную активность дозозависимым способом. Глицерол- и  $\text{Ca}^{2+}$ -

potentially feasible due to the glycerol perturbation in a plasma membrane structure. And if at the same time the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity is observed, an increase in rate of  $\text{Ca}^{2+}$  entrance into a cell will be compromised by the growth of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, oriented to the a certain balance recovery between these counter-current cation flows through a membrane. Further inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity rate approximately by 20-25% at an increase in glycerol concentration in the medium is evidently not able to significantly affect the growth of  $\text{Ca}^{2+}$  intracellular concentration at the background of previous changes. Thus, one should expect that if there is an increase in cytosol calcium level before cryopreservation, it does not overstep the limits of physiological ranges. Biochemical modification and a change in physical and chemical medium parameters are thereby appeared to contribute to erythrocyte stabilisation during freeze-thawing.

Of note is that the revealed by us regularities do not quite correlate with previous results [2]. When estimating the specific ATPase activity the calculation was performed per 1 l of erythrocytes or restored erythrocyte ghosts. This calculation appears to be not quite a correct, since not taking into account a change in cell volume during incubation with glycerol, resulted in the fact that the less number of functional units will occur in the blood volume unit, selected to measure the studied characteristics. The investigations performed (Table) show a change in some parameters after erythrocyte incubation with glycerol. These data confirm the necessity to apply a different way for calculating the specific activity based on cell amount in a sample.

In addition, the differences between our data and the results presented [2] can be related to the usage of different model system (saponin-perforated erythrocytes) [5], that enables to preserve in the medium of enzyme hydrolysis all endogenous regulators, affecting the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. The conditions for endogenous modulator involvement into the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity regulation at a change in medium parameters are thereby created. The necessity to take into account the peculiarities of model system when estimating the results obtained during erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase study [3] allows to avoid the irreconcilable differences when comparing the data of various works.

An activating glycerol effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase was demonstrated at hydrolysis of pseudosubstrate: P-nitrophenylphosphate [8]. The authors showed that at glycerol presence  $\text{Ca}^{2+}$  strongly stimulated the phosphatase activity by a dose-dependent way. Glycerol and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced increase in the activity correlated with a change in emission wavelength of own fluorescence of enzyme. Glycerol and  $\text{Ca}^{2+}$  synergic effect is considered as related with dehyd-

Изменение характеристик суспензии эритроцитов после инкубации с глицеролом, криоконсервирования и деглицеринизации клеток

Change in characteristics of erythrocyte's suspension after incubation with glycerol, cryopreservation and cell deglycerolisation

Исследуемые параметры Studied parameters	Условия эксперимента Experiment conditions			
	Эритроциты в среде А Erythrocytes in medium A	Эритроциты в растворе криоконсерванта Erythrocytes in a cryopreservative solution	Деконсервированная суспензия эритроцитов в среде криоконсерванта Frozen – thawed erythrocyte suspension in a cryopreservative medium	Эритроциты после деглицеринизации Erythrocytes after deglycerolisation
Число клеток в 1 мкл ( $\times 10^6$ ) Cell number in 1 $\mu$ l ( $\times 10^6$ )	4,5 $\pm$ 0,35	4,5 $\pm$ 0,29	3,8 $\pm$ 0,32	4,5 $\pm$ 0,38
Гематокрит Hematocrit	46 $\pm$ 2,2	53 $\pm$ 2,8	42 $\pm$ 3,0	45 $\pm$ 2,1
Уровень гемолиза в надосажке, % Hemolysis level in supernatant, %	–	–	18 $\pm$ 3,0	17 $\pm$ 2,5

**Примечание:** при всех условиях эксперимента растворы добавляли к клеточной суспензии в равном объеме.

**Notes:** under all experimental conditions the solutions were added to cell suspension in equal volume.

индуцированное увеличение активности коррелировало с изменением длины волны эмиссии собственной флуоресценции фермента. Полагают, что синергический эффект глицерола и  $\text{Ca}^{2+}$  связан с эффектом дегидратации на субстрат-связывающий и  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий домены данной ионтранспортирующей системы.

Таким образом, структурная модификация белковой молекулы под влиянием глицерола может быть одной из причин изменения  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности эритроцитов. Еще одной из причин роста скорости ферментативной реакции под его влиянием может быть модификация физико-химических параметров плазматической мембраны. Глицерол в незначительных концентрациях способствует росту порядка в структуре мембраны [6]. Изменение упорядоченности липидного микроокружения  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в этих условиях может облегчать конформационные переходы в структуре  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующей системы в каталитическом цикле. Известно, что глицерол при увеличении его концентрации в среде способен изменять подвижность мембранных белков [7]. Как было установлено на везикулах саркоплазматического ретикулума, средний размер олигомерных комплексов  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в присутствии глицерола увеличивается за счет агрегации мономеров фермента. При этом переход фермента из E1- в E2-конформацию сопровождается образованием короткоживущих олигомерных комплексов [7], что позволяет рассматривать способность глицерола влиять на агрегатное состояние молекул фермента как один из механизмов его активизирующего

effect on the substrate-binding and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domains of this ion-transporting system.

Thus, a structural modification of protein molecule under glycerol effect can be one of the reasons of change in the erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. One more cause for the rate increase in the enzyme reaction under its effect can be the modification of physical and chemical parameters of plasmatic membrane. Glycerol in slight concentrations contributes to the order increase in membrane structure [6]. The change in ordering of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase lipid microenvironment under these conditions can facilitate the conformational passages in the structure of  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting system in catalytic cycle. It is known that glycerol with an increase in its concentration in the medium is capable to change the membrane protein mobility [7]. As it was revealed on the vesicles of sarcoplasmic reticulum, an average size of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase oligomeric complexes augmented at glycerol presence due to the enzyme monomers' aggregation. At the same time the enzyme transfer from E1 to E2- conformation is accompanied with the formation of short-living oligomer complexes [7], that enables to consider the glycerol capability to affect an aggregate state of enzyme's molecules as one of the mechanisms of its activating effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. It appears to facilitate the certain conformational transfers in a reaction cycle and accelerate the ATP hydrolysis.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of erythrocyte's plasmatic membrane is known to be structurally presented by two isoforms: PMCA1b and PMCA4b [14]. Both isoforms possess two autoinhibitor domains, enabling the performance of a delicate regulation of ATPase and

действия на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу. Возможно, это облегчает определенные конформационные переходы в ходе реакционного цикла и ускоряет гидролиз АТФ.

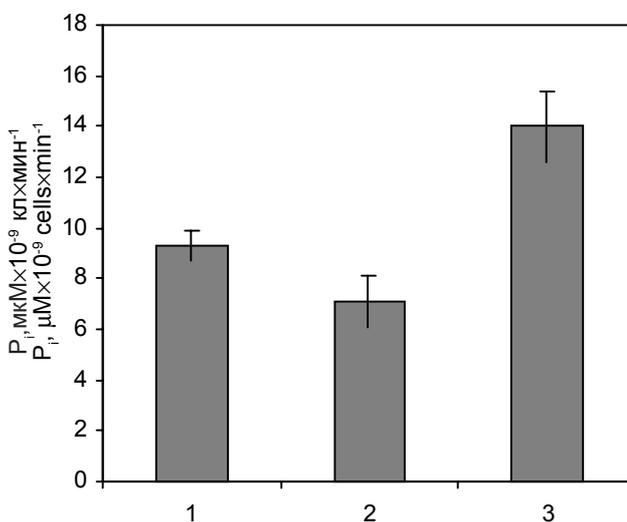
Известно, что в структурном отношении  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы плазматической мембраны эритроцитов представлена двумя изоформами - РМСА1b и РМСА4b [14]. Обе изоформы обладают двумя аутоингибиторными доменами, которые позволяют осуществлять тонкую регуляцию АТФазной и  $\text{Ca}^{2+}$ -транслоцирующей активности фермента. Можно также предположить, что многочисленные модуляторы могут активировать либо ингибировать  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу нейтрализацией или активацией этих аутоингибиторных доменов при изменении физико-химических параметров среды. Если предположить, что активирующий эффект глицерола на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу связан с влиянием на структуру аутоингибирующих доменов, то, скорее всего, этот эффект реализуется с участием модуляторов  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности.

Замораживание эритроцитов под защитой глицерола показало, что в суспензии клеток, сохранивших целостность после замораживания-отогрева (рис.2), активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы поддерживается на уровне ниже контрольных величин. После удаления глицерола и многоэтапной отмывки активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в эритроцитах выше, чем в нативных клетках. Этот факт не имеет четкого объяснения. Можно предположить несколько причин, определяющих поведение  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в этих условиях. Поскольку в процессе замораживания и отмывки гибель клеток составляет примерно 30%, то состав субпопуляций в нативной суспензии и в суспензии после деглицеринизации клеток, очевидно, будет отличаться. Субпопуляция старых эритроцитов характеризуется более высокими концентрациями внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  из-за снижения активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и более чувствительна к различным стрессовым воздействиям [12]. Очевидно, что значительная часть клеток, погибших в процессе криоконсервирования, будет представлена именно старыми эритроцитами. Следовательно, средний показатель  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности в суспензии, состоящей из более молодых клеток, окажется выше, чем в нативной эритроцитомассе, где вклад  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности старых клеток снижает средние значения. Однако более высокие значения данного параметра в эритроцитах после завершения всех этапов отмывки от глицерола в криоконсервированной клеточной суспензии можно рассматривать как компенсаторный механизм, связанный с временным угнетением работы фермента на предшествующих этапах.

После размораживания эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерола, обяза-

$\text{Ca}^{2+}$ -translocating enzyme activity. We can also assume that numerous modulators can activate or inhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by neutralising or activating these autoinhibitor domains under change in physical and chemical parameters of medium. If supposing, that an activating glycerol effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is related to the effect on the autoinhibiting domains' structure, this effect is mostly realised with participation of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity modulators.

Erythrocyte freezing under glycerol protection demonstrated that in cell suspension, kept the integrity after freeze-thawing (Fig. 2), the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was maintained at the level lower the control values. After glycerol removal and multi-step washing-out the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in erythrocytes is higher than in native ones. This fact has no distinct explanation. Some causes, determining the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase behaviour under these conditions can be assumed. Since during freezing and washing-out the cell death makes approximately 30%, the subpopulation composition in native suspension and in that after cell deglycerolisation will be obviously different. The subpopulation of old erythrocytes is characterised by higher concentration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  due to a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and is more sensitive to different stress effects [12]. Evidently, a considerable part of dead cells at cryopreservation will be presented namely by old erythrocytes. Consequently, an average index of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in the suspension, consisting of younger cells, will be higher, than in native erythromass, where the contribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of old cells



**Рис. 2.** Влияние замораживания-отогрева и отмывки на состояние  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов: 1 – нативные клетки; 2 – клетки после замораживания-отогрева; 3 – клетки после завершения многоэтапной отмывки глицерола.

**Fig. 2.** Freeze-thawing and washing-out effect on erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase state: 1 – native cells; 2 – cells after freeze-thawing; 3 – cells after completing the multi-step glycerol washing-out.

тельна деглицеринизация клеток. Наиболее часто для этой цели используются растворы NaCl, обеспечивающие поддержание осмотического баланса и одновременно предназначенные для снижения концентрации глицерола в среде. В этих условиях возможно изменение концентрации солей внутри клетки. Изменение ионной силы среды, в которой функционируют ионтранспортирующие системы плазматической мембраны, может быть важным моментом в регуляции их активности. На рис.3 представлены результаты, отражающие изменения активности Ca<sup>2+</sup>-АТФазы при повышении концентрации NaCl в среде ферментативного гидролиза в клетках, подвергнутых замораживанию-отогреву под защитой глицерола (1), в нативных эритроцитах в среде с 15%-й концентрацией глицерола (2) и в среде, его не содержащей (3).

Необходимо обратить внимание на начальную точку, отражающую отличия между сравниваемыми группами в условиях физиологических значений ионной силы. Было установлено, что в нативных эритроцитах без глицерола и в эритроцитах с 15%-й концентрацией глицерола в среде не обнаруживается достоверно значимых различий в активности Ca<sup>2+</sup>-АТФазы. В то же время после криоконсервирования эритроцитов под защитой глицерола уровень АТФазной активности ниже, чем в контроле. Следовательно, действие низких температур в определенной степени затрагивает либо структуру фермента, либо его липидное микроокружение. Однако падение активности может отражать также вклад одной из сублетальных популяций эритроцитов, которые неминуемо погибают в процессе отмывки, о чем свидетельствует уровень гемолиза по завершении всех этапов деглицеринизации (таблица).

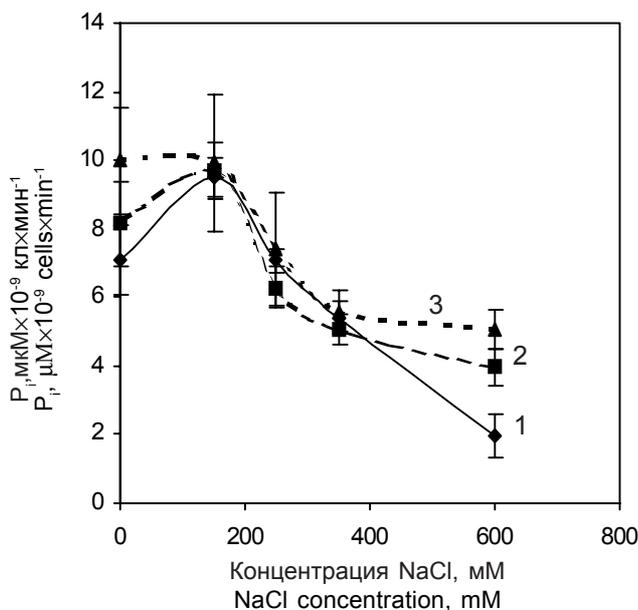
Как видно из данных, представленных на рис. 3, с увеличением ионной силы раствора активность Ca<sup>2+</sup>-АТФазы начинает падать. Кажущееся повышение ферментативной активности при введении в среду дополнительно 150 мМ NaCl недостоверно в сравнении с контрольными значениями. Достоверно значимое снижение Ca<sup>2+</sup>-АТФазной активности отмечается лишь при превышении 350 мМ концентрации NaCl в среде в дополнение к физиологическим значениям ионной силы раствора, определяемой составом реакционной среды, применяемой для анализа Ca<sup>2+</sup>-АТФазной активности. В области высоких концентраций снова начинают проявляться особенности поведения Ca<sup>2+</sup>-АТФазной активности криоконсервированных эритроцитов. В присутствии 600 мМ NaCl каталитическая активность Ca<sup>2+</sup>-насоса в таких эритроцитах ниже, чем в нативных клетках, что, по-видимому, отражает структурную

reduces the average values. However, higher values of this parameter in erythrocytes after completing all these steps of washing-out of glycerol in a cryopreserved cell suspension can be considered as a compensatory mechanism, related to a temporary suppression of enzyme activity at previous stages.

After erythrocyte freeze-thawing, cryopreserved under glycerol protection, the deglycerolisation procedure is mandatory. The NaCl solutions, providing the maintenance of osmotic balance and simultaneously designated to reduce the glycerol concentration in the medium, are most frequently used for this purpose. Under these conditions a change in salt concentration inside a cell is possible. A change in the medium ion strength, where ion-transporting systems of plasma membrane are functioning, may be an important moment in their activity regulation. The Fig. 3 shows the results, reflecting the changes in Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity at an increase in NaCl concentration in the enzyme hydrolysis medium in cells, subjected to freeze-thawing under glycerol protection (1), in native erythrocytes in 15% glycerol medium (2) and in glycerol-free one (3).

The attention should be paid to the initial point, reflecting the differences between the compared groups under conditions of physiological values of ion strength. It was established that in native glycerol-free erythrocytes and in those with 15% glycerol concentration in the medium, no statistically significant differences in Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity were observed. At the same time after erythrocyte cryopreservation under glycerol protection the level of ATPase activity is lower than in the control. Consequently, the low temperature influence affects under certain extent either enzyme structure, or its lipid microenvironment. However the activity decrease may reflect the contribution of one of the sublethal erythrocyte populations, which inevitably die during washing-out, testified by the hemolysis level after completing all steps of deglycerolisation (Table).

The data in Fig.3 show that with an increase in the solution ion strength the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity starts to fall. An apparent increase in the enzyme activity during an additional introduction of 150 мМ NaCl into the medium is not statistically significant in comparison with the control values. Statistically significant decrease in Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity is observed only at exceeding 350 мМ of NaCl concentration in the medium, as addition to physiological values of the solution ion strength, determined by the composition of a reaction medium, applied for analysis of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. In the field of high concentrations the behaviour peculiarities of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cryopreserved erythrocytes restart their manifestation. At the presence of 600 мМ NaCl a catalytic activity of Ca<sup>2+</sup>-



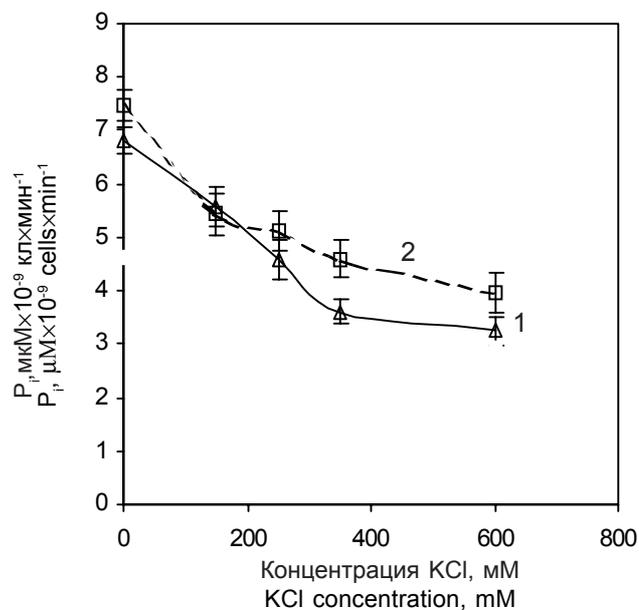
**Рис.3.** Зависимость скорости работы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов от концентрации солей в среде: 1 – деконсервированные эритроциты, содержащие глицерол; 2 – нативные эритроциты в среде с глицеролом; 3 – нативные эритроциты без глицерола.

**Fig. 3.** Dependence of erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity rate on salt concentration in medium: 1 – glycerol-containing frozen-thawed erythrocytes; 2 – native erythrocytes in the medium with glycerol; 3 – glycerol-free native erythrocytes.

модификацию фермента под влиянием низких температур.

В данной серии экспериментов для подавления активности Na-насоса использовали ингибитор – 1 мМ оуабаина. Показано [4], что оуабаин при низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  активирует  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу, а при более высоких – ингибирует. Чтобы убедиться, что в наших экспериментальных условиях изменения  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазной активности отражают действительно влияние ионной силы растворов, а влияние ингибитора оуабаина не было артефактом, способным повлиять на результаты, провели еще серию экспериментов, в которых активность Na-насоса блокировалась отсутствием в среде необходимых для его работы лигандов. С этой целью ионную силу раствора изменяли введением в среду аналогичных концентраций KCl. Данные, представленные на рис. 4, подтверждают реальное влияние ионной силы растворов на поведение  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов и не отражают специфику модифицирующего влияния ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в условиях значительного превышения их физиологической концентрации в среде.

Таким образом, модификация активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз под влиянием глицерола, низких температур, высокой ионной силы свидетельствует об участии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и систем, регулирующих их уровень в клетках, в процессах стабилизации и дестабилизации клеток к стрессовым воздействиям.



**Рис. 4.** Зависимость скорости работы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов от концентрации KCl в среде: 1 – KCl; 2 – KCl + 15%-й глицерол.

**Fig. 4.** Dependence of erythrocytes'  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity rate on KCl concentration in medium: 1 – KCl; 2 – KCl + 15% glycerol.

pump in such erythrocytes is lower than in native cells, that, apparently, reflects the enzyme structural modification under low temperature effect.

In these series of experiments we used the 1mM ouabain inhibitor to suppress  $\text{Na}^+$ -pump activity. It was shown [4] that ouabain under low  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations activated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, but inhibited it under higher ones. In order to make certain that under our experimental conditions the changes in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity really reflect the effect of ion strength of solutions and the influence of ouabain inhibitor was not the artefact, capable to affect the results, we carried-out one more experimental series where Na-pump activity was blocked by the absence of ligands in the medium, necessary for its work. With this purpose we measured the solution's ion strength by introducing the same KCl concentrations into the medium. The data in Fig. 4 confirm a real effect of solutions' ion strength on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erythrocyte behaviour and do not reflect the specificity of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  ion modifying effect under conditions of a considerable excess of their physiological concentration in the medium.

Thus, the modification of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity under the effect of glycerol, low temperatures, high ion strength testifies to the participation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions and systems, regulating their level in cells, in the processes of cell stabilisation and destabilisation to stress effects.

## Выводы

Изменение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в сапонин-перфорированных эритроцитах под влиянием глицерола имеет бифазный характер. Небольшие концентрации глицерола активируют работу фермента, достигая максимального эффекта при 10%-м содержании криопротектора в среде. Высокие его концентрации вызывают ингибирование. Очевидно, модификация  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов под влиянием глицерола связана как с изменениями физико-химических параметров среды, так и с вовлечением эндогенных модуляторов в регуляцию ее активности.

Низкотемпературное консервирование, высокая ионная сила и процесс деглицеринизации изменяют параметры работы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов, что может повлиять на стабильность клеток в стрессовых условиях.

## 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. *Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М.* Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 207 с.
3. *Орлов С.Н.* Кальмодулин // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии.– М., 1987.– 404 с.
4. *Петруняк В.В., Панюшкина Е.А., Северена Е.А.* Активация и ингибирование  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы мембран эритроцитов эндогенными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми регуляторами.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое действие оубаина на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу // Биол. мембраны.– 1990.– Т. 7, №4.– С. 352-357.
5. *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.
6. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наук.думка, 1978.– 204 с.
7. *Рубцов А.М., Болдырев А.А., Личунь Янг и др.* Исследование вращательной подвижности E1- и E2- конформеров  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в мембранах саркоплазматического ретикула с использованием метода анизотропии фосфоресценции с высоким временным разрешением // Биохимия.– 1994.– Vol. 59, №11.– С.1698-1705.
8. *Alves G.G., Lima L.M., Favero-Retto M.P. et al.* P-nitrophenylphosphatase activity catalyzed by plasma membrane ( $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase): correlation with structural changes modulated by glycerol and  $\text{Ca}^{2+}$  // Biosci. Rep.– 2001.– Vol. 21, N1.– P.25-32.
9. *Lelkens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al.* Stability after thawing of red blood cells frozen with high - and low-glycerol method // Transfusion.– 2003.– Vol. 43, N2.– P.157-164.
10. *Lippert S., Bock H., Rahring S. et al.* Cryopreservation of erythrocytes detailed quality control // Beitr. Infusionsther. Transfusionsmed.– 1996.– Vol. 33.– P. 117-120.
11. *Rathbun 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.

## Conclusions

Change in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in saponin-perforated erythrocytes under glycerol effect is of biphasic character. Low glycerol concentrations activate the enzyme activity, by achieving the maximum effect at 10% cryoprotectant content in the medium. Its high concentrations cause the inhibition. Modification of erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase under glycerol effect is obviously related to both the changes in physical and chemical medium parameters and to the involvement of endogenous modulators into its activity regulation.

Low temperature preservation, high ion strength and deglycerolisation process change the parameters of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erythrocyte activity that may affect cell stability under stress conditions.

## References

1. *Babiychuk L.A., Zemlyanskikh N.G.* Effect of temperature and PEO-1500 cryoprotectant on the nature cytoskeletal protein modification and red blood cell stability during cryopreservation // Problemy kriobiologii.– 1994.– N2.– P.7-11.
2. *Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M.* Barrier properties of biomembranes under low temperatures.– Kiev: Naukova Dumka, 1988.– 207p.
3. *Orlov S.N.* Calmodulin // Itogi Nauki i tekhniki. Issue: General problems of physical and chemical biology.– Moscow, 1987.– 404 p.
4. *Petrynyaka V.V., Panyushkina E.A., Severena E.A.* Activation and inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase of erythrocyte membranes by endogenous  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulators.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent effect of ouabain on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase // Biologicheskie membrany.– 1990.– Vol. 7, N4.– P. 352-357.
5. *Pokudin N.I., Petrunyaka V.V., Orlov S.N.* Does calmodulin participate in regulation of Ca-pump activity in erythrocytes *in vivo*? // Biokhimiya.– 1988.– Vol. 53, N5.– P.753-758.
6. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova Dumka, 1978.– 204p.
7. *Rubtsov A.M., Boldyrev A.A., Lichun' IA, McStay et al.* Study of the rotation mobility of E1- and E2-conformers of Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum membranes using a time-resolved phosphorescence anisotropy method // Biokhimiya.– 1994.– Vol. 59, N11.– P.1698-1705.
8. *Alves G.G., Lima L.M., Favero-Retto M.P. et al.* P-nitrophenylphosphatase activity catalyzed by plasma membrane ( $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase): correlation with structural changes modulated by glycerol and  $\text{Ca}^{2+}$  // Biosci. Rep.– 2001.– Vol. 21, N1.– P.25-32.
9. *Lelkens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al.* Stability after thawing of red blood cells frozen with high- and low-glycerol method // Transfusion.– 2003.– Vol. 43, N2.– P. 157-164.
10. *Lippert S., Bock H., Rahring S. et al.* Cryopreservation of erythrocytes detailed quality control // Beitr. Infusionsther. Transfusionsmed.– 1996.– 33.– P. 117-120.
11. *Rathbun W., Betlark V.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in the person of cystein and adenosin triphosphate // Anal. Biochem.– 1969.– Vol. 28, N1-3.– P.436-445.
12. *Romero P.J., Romero E.A.* The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: a proposal // Blood Cell Mol. Dis.– 1999.– Vol. 25, N1.– P.9-19.
13. *Sputtek A., Horn E.P., Schulte Am Esch J., Kuhn I.P.* Cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl

12. *Romero P.J., Romero E.A.* The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: a proposal // *Blood Cell Mol. Dis.*—1999.— Vol. 25, N1.— P. 9-19.
13. *Sputtek A., Horn E.P., Schulte Am Esch J., Kuhn P.* Cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch (HES) – From laboratory investigation to clinical application // *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.*— 2001.— Vol. 36, N2.— P. 162-164.
14. *Strehler E.E., Zacharias D.A.* Role of alternative splicing in generating isoforms diversity among plasma membrane calcium pumps // *Physiol. Rev.*— 2001.— Vol. 81, N1.— P. 21-50.
15. *Thomas M.J., Parry E.S., Nash S.G., Bell S.H.* A method for the cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch as a cryoprotectant // *Transfus. Sci.*— 1996.— Vol. 17, N3.—P. 385-396.
16. *Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A., Connor J.* Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // *Cryobiology.*— 2002.— Vol. 45, N2.— P. 153-166.
- starch (HES) – From laboratory investigation to clinical application // *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.*— 2001.— Vol. 36, N2.— P.162-164.
14. *Strehler E.E., Zacharias D.A.* Role of alternative splicing in generating isoforms diversity among plasma membrane calcium pumps // *Physiol. Rev.*— 2001.— Vol. 81, N1.— P. 21-50.
15. *Thomas M.J., Parry E.S., Nash S.G., Bell S.H.* A method for the cryopreservation of red blood cells using hydroxyethyl starch as a cryoprotectant // *Transfus. Sci.*— 1996.— Vol. 17, N3.— P.385-396.
16. *Wagner C.T., Martowicz M.L., Livesey S.A., Connor J.* Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // *Cryobiology.*— 2002.— Vol. 45, N2.— P.153-166.

*Accepted in 21.12.2004*

*Поступила 21.12.2004*