

УДК 57.012.6:57.016

ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ Ca^{2+} -АТФази В ЕРИТРОЦИТАХ ПІСЛЯ ДІЇ КРІОПРОТЕКТОРУ**ДЕНИСОВА О. М.**, к. біол. н.
ВОДОП'ЯНОВА Л. А., к. біол. н.Харківська державна зооветеринарна
академія, м. Харків
denisova78@mail.ru

Досліджували активність Ca^{2+} -АТФази еритроцитів коня в перфорованих сапоніном клітинах в процесі кріоконсервування з різними концентраціями ДМСО. Показано, що високі концентрації ДМСО (15%) гальмують активність АТФази, а невеликі концентрації кріопротектора (5-10 %), не впливають на роботу ферменту. При заморожуванні-відігріві і видаленні кріопротектора активність Ca^{2+} -АТФази еритроцитів коня достовірно не змінюється порівняно з контрольними клітинами.

Ключові слова: еритроцити коня, кріоконсервування, диметилсульфоксид (ДМСО), Ca^{2+} -АТФаза.

Постановка проблеми. Останнім часом у ветеринарній практиці розробляють різні методи кріоконсервування еритроцитів тварин [4, 7]. У попередніх наших дослідженнях показана ефективність диметилсульфоксиду (ДМСО) для кріоконсервування еритроцитів коня, але після низькотемпературного зберігання клітини мають бути не лише цілими, але і функціонально повноцінні [1, 3, 6, 11]. Різні чинники низькотемпературної дії можуть змінювати швидкість біохімічних реакцій в клітинах, що може впливати на їх функції, а також вплив ДМСО на системи мембранного транспорту можуть мати вирішальне значення для виживання клітин в стресових умовах.

Мета досліджень. Вивчити зміни активності Ca^{2+} - АТФази еритроцитів коня під впливом різних концентрацій ДМСО та чинників кріоконсервування.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом дослідження були еритроцити коня. Усі тварини були здоровими, статевозрілими самцями. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Після видалення плазми і лейкоцитарного шару еритроцити тричі промивали ізотонічно сольовим розчином (150 мМ NaCl, 5 мМ фосфатний буфер, рН 7,4).

Для визначення активності Ca^{2+} – АТФази [5] еритроцити вносили в середовище А (0,04% сапоніну, 1 мМ АТФ, 1 мМ EGTA, 0,025 мМ MgCl_2 , 10 мМ HEPES, 135 мМ KCl, 1,1 мМ CaCl_2 , 10 мМ Трис, рН 7,4). Активність

Ca^{2+} -АТФази оцінювали по різниці накопичення неорганічного фосфату в пробах. Залежно від конкретних експериментальних завдань, у склад середовища додавали різні концентрації ДМСО (5 – 15 %). Реакцію ферментативного гідролізу АТФ відстежували, інкубуючи клітини при 37°C впродовж 20 хв. Після чого реакцію зупиняли, додаючи холодний розчин ТХУ до кінцевої концентрації 5%. Рівень неорганічного фосфору в пробах визначали по методу [9]. Питому активність Ca^{2+} -АТФази еритроцитів розраховували на 10^9 клітин. Підрахунок клітин в пробах проводили в камері Горяєва.

Для оцінки впливу чинників кріоконсервування на Ca^{2+} -АТФазну активність були проведені експерименти по заморожуванню клітин в рідкому азоті. Для кріоконсервування еритроцитів коня був використаний кріоконсервант, який містив 20% диметилсульфоксид (ДМСО); 150 мМ NaCl; 5мМ фосфатний буфер, рН 7,4 Розчин змішували з еритромасою в співвідношенні 1:1. Заморожування здійснювали шляхом занурення металевих контейнерів об'ємом 10 мл в рідкий азот (-196°C). Деконсервовані клітини були розділені на дві частини. Клітини першої частини осаджували центрифугуванням при 350 g та| переносили в середовище А для проведення ферментативної реакції. Паралельно оцінювали рівень гемолізу і підрахунок клітин. В іншій частині клітин видаляли кріопротектор [10]. Після завершення відмивальних процедур клітини переносили в середовище А і визначали активність Ca^{2+} -АТФази, як зазначено вище. Паралельно оцінювали кіль-

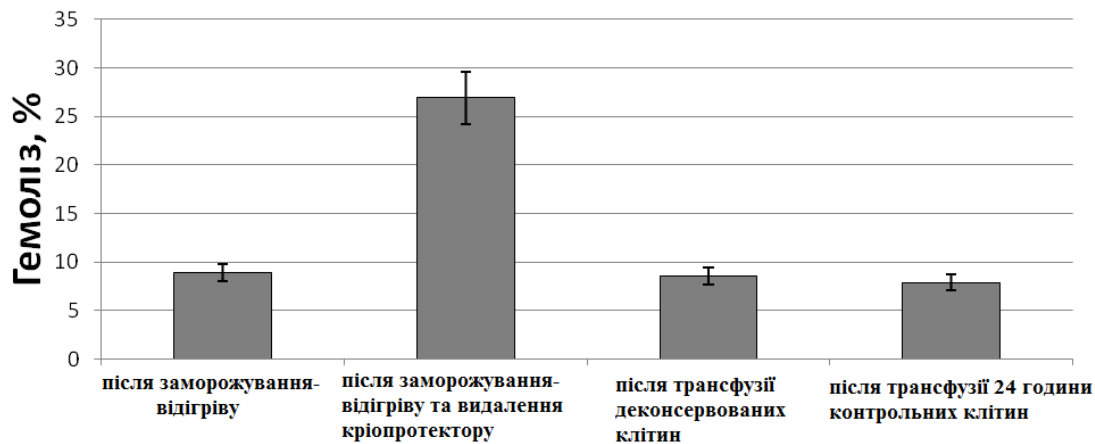


Рис. 1. Рівень гемолізу еритроцитів коня після кріоконсервування і моделювання трансфузії.

кість клітин в пробі і рівень гемолізу.

Результати досліджень та їх обговорення. Оцінка збереження еритроцитів коня після кріоконсервування (рис. 1) показала, що ДМСО є досить ефективним криопротектором. Частка гемолізу відразу після розморожування клітин склала 8,86 %, після видалення криопротектору збільшилася до 26,9 %.

Для оцінки стабільності кріоконсервованих клітин моделювали умови трансфузії. У вибраній нами моделі було показано, що гемоліз в суспензії кріоконсервованих клітин впродовж 24 годин не досягав відмінностей порівняно з контролем.

Фізіологічна роль еритроцитів пов'язана із здійсненням газообміну між тканинами і зовнішнім середовищем. Ефективна доставка кисню і видалення вуглекислого газу можлива в умовах збереження не лише властивостей мембрани, але й нормального метаболічного потенціалу клітини. Зміна каталітичних властивостей Ca^{2+} -АТФази на різних стадіях кріоконсервування може вплинути на збереження і життєздатність еритроцитів.

У процесі інкубації еритроцитів з ДМСО відбувається насичення клітин криопротектором. У цитоплазмі збільшується концентрація цієї речовини, що може вплинути на роботу

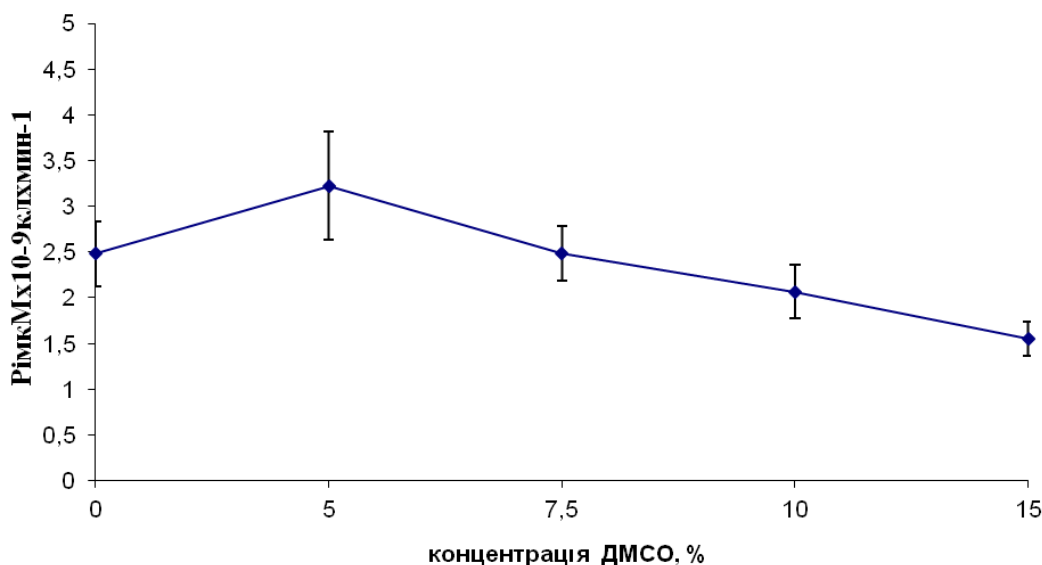


Рис. 2. Вплив ДМСО на активність Ca^{2+} -АТФази еритроцитів коня

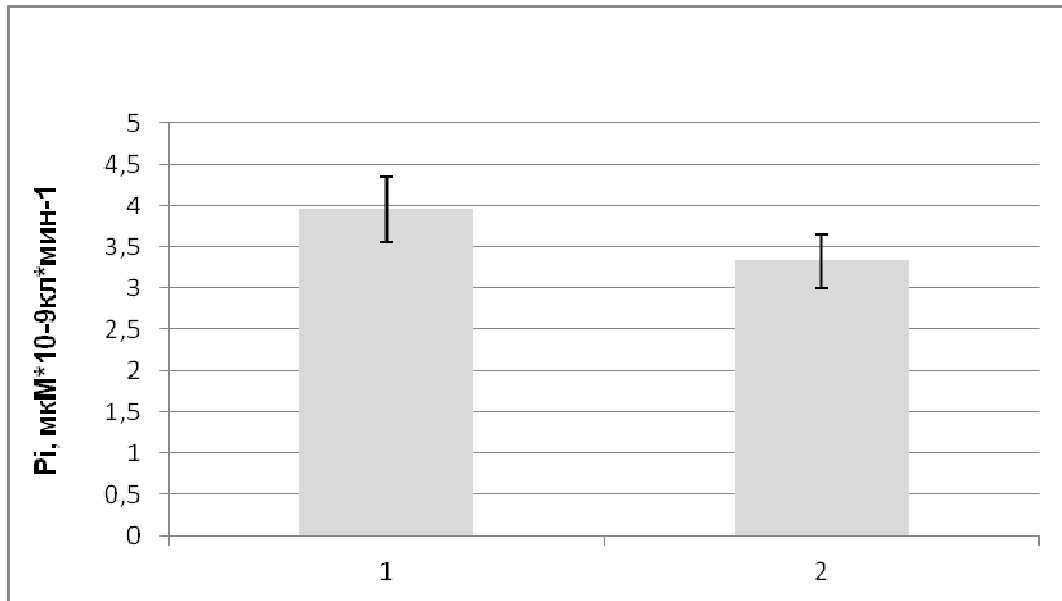


Рис. 3. Вплив заморожування-відігрівання та відмивання на стан Ca^{2+} - АТФази еритроцитів коня:

1 – контрольні клітини;
2 – клітини після заморожування-відігріву та видалення криопротектору.

ферментів. Динаміку насичення клітин ДМСО та зміну активності Ca^{2+} -АТФази в ході цього процесу досліджували в середовищах з різними концентраціями криопротектору.

Активність Ca^{2+} -АТФази в еритроцитах коня при додаванні 7,5 % та 10 % ДМСО достовірно не відрізняється від контрольних значень (рис. 2). В умовах, коли концентрація ДМСО досягає 15 %, відзначається достовірне зниження активності ферменту нижче контрольних величин. Отримані дані відрізняються від результатів, представлених у роботах [2], де оцінка дії криопротектору проводилася на ізольованій Ca^{2+} -АТФазі. Дія криопротектору на клітинну систему в цій роботі представлена у вигляді сапонін-перфорованих клітин. Можливо, це є складнішою моделлю. Можна припустити, що інгібуюча дія ДМСО на клітину пов'язана з модифікацією ліпідного бішару або ендогенних регуляторів. Такий вплив може полягати в основі псевдотоксичного ефекту. Відомо [8], що в концентрації вище 1 М ДМСО має токсичні властивості, зникаючи після видалення криопротектору з клітини.

На рис. 3 представлена оцінка ферментатив-

ної активності в еритроцитах після кріоконсервування під захистом ДМСО (10%). Видно, що активність Ca^{2+} - АТФази в еритроцитах коня, що збереглися, не має достовірних відмінностей від контролю. Але середнє значення виглядає дещо нижче, ніж в нативних клітинах.

Модифікація активності Ca^{2+} - АТФази під впливом ДМСО і низьких температур свідчить про участь іонів Ca^{2+} та систем, що регулюють їх рівень.

Висновки та перспективи подальших розробок.

1. Кріоконсервування еритроцитів коня під захистом ДМСО супроводжується змінами активності Ca^{2+} - АТФази.

2. Зміни активності Ca^{2+} - АТФази виражені при використанні досить високих концентрацій диметилсульфоксиду.

3. Порушення активності ферменту носить зворотній характер і зникає при видаленні криопротектору з клітин.

Таким чином, подальше дослідження активності Ca^{2+} - АТФази в клітинах, що прибувають під впливом ДМСО і низьких температур допоможе розробляти способи стабілізації і адаптації клітин до стресових дій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аграненко В. А. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий / Аграненко В. А., Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И. – М.: МЗ СССР, 1980. – 47 с.
2. Гулевский А. К. Барьерные свойства биомембран при низких температурах / Гулевский А. К., Бондаренко В. А., Белоус А.М. – Киев: Наук. думка, 1988. - 208 с.
3. Жегунов Г. Ф. Криоконсервирование и сохранность эритроцитов животных / Г. Ф. Жегунов, О. Н. Денисова, Н.Г. Землянских // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.3., – №3. – С. 566 – 569.
4. Кудрявцев А. А. Клиническая гематология животных / А. А. Кудрявцев, Л.А. Кудрявцева – М.: Колос, 1974. – 398 с.
5. Покудин Н. И. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах *in vivo* / Н.И. Покудин, В.В. Петруняка, С.Н. Орлов // Биохимия. – 1988. – Vol. 53, – № 5. – С. 753–758.
6. Пушкарь Н. С. Криопротекторы / Н.С. Пушкарь, М.И. Шраго, А.М. Белоус, Ю.В. Калугин. – Киев: Наукова думка, 1978. – 204 с.
7. Румянцев А. Г. Клиническая трансфузиология / А. Г. Румянцев, В. А. Аграненко. – ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1997. – 576 с.
8. Chaekenberghe D. L. Current status of the use of frozen red cells: a review of problems with penetrating and non-penetrating cryoprotectants / D.L. Chaekenberghe // Cryo. Letters. – 1996. – Vol. 17, №5. – P. 281 – 286.
9. Rathbun W. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. Rathbun, V. Betlach // Anal. Biochem. – 1969. –Vol. 28, № 1–3. – P. 436–445.
10. Sumida S. Cryomedicine / Sumida S. // Low Temp. Med. – 2005. – Vol.31, №1. – P. 25-31.
11. Valeri C. R. Horse red blood cells frozen with 20% (w/v) glycerol and stored at -150 C for five years / C.R. Valeri, D.A. Valeri, A. Gray // Am. J. Vet. Res. – 1983. – Vol. 44, №11. – P. 2200 – 2202.

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ Ca^{2+} -АТФазы В ЭРИТРОЦИТАХ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРА

Денисова О. Н., Водопьянова Л. А.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Исследовали активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов лошади в сапонин-перфорированных клетках в процессе криоконсервирования с различными концентрациями ДМСО. Показано, что высокие концентрации ДМСО (15%) тормозят активность АТФазы, а небольшие концентрации криопротектора (5-10 %) не влияют на работу фермента. При замораживании-отогреве и удалении криопротектора активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов лошади достоверно не изменяется по сравнению с контрольными клетками.

Ключевые слова: эритроциты лошади, криоконсервирование, диметилсульфоксид (ДМСО), Ca^{2+} -АТФаза.

RESEARCH OF ACTIVITY Ca^{2+} -ATPase IN ERYTHROCYTES AFTER EFFECT OF CRYOPROTECTANT

O. Denysova, L. Vodopyanova

Kharkiv state zooveterinary academy, Kharkiv

In veterinary practice developed various methods of cryopreservation of animals` red blood cells. In our previous studies have shown the effectiveness of dimethylsulfoxide (DMSO) for cryopreservation of horses erythrocyte, but after low temperature storage cells should not only intact, but functionally complete. Various factors of low action can change the speed of biochemical reactions in cells, which may influence on their function and influence of DMSO on membrane transport systems can be crucial for cell survival under stressful conditions.

To study changes in the activity of Ca^{2+} -ATPase horse red blood cells under the influence of different concentrations of DMSO cryopreservation and factors.

The activity of Ca^{2+} -ATPase in saponin-perforated red blood cells of horse in the process of cryopreservation with the different concentrations of DMSO has been studied. It has been shown that the high concentrations of DMSO (15%) inhibited the activity of ATPase, but low concentrations of cryoprotectants (5-10 %) did not influence the work of the enzyme. The activity of Ca^{2+} -ATPase of horses erythrocytes in the process of cryopreservation and cryoprotectant elimination do not trustworthy change as compared with control one.

Modification of the activity of Ca^{2+} -ATPase in the influence of DMSO and low temperatures indicates the participation of Ca^{2+} and systems that direct their level.

Conclusions and prospects for further development. Cryopreservation of horses erythrocytes with DMSO accompanied by changes in the activity of Ca^{2+} - ATPase. Changes in the activity of Ca^{2+} - ATPase expressed using relatively high concentrations of dimethylsulfoxide. Violation of enzyme activity is reversible and disappears when you remove cryoprotectant from cells.

Thus, further research activities Ca^{2+} -ATPase in cells that come under the influence of DMSO and low temperatures will help develop ways to stabilize and adaptation of cells to stress action.

Key words: *red blood cells of horse, cryopreservation, DMSO, Ca^{2+} -ATPase.*
