Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ, ОНКОГЕМАТОЛОГИИ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

3-4 октября 2017 года

Киров – 2017

Овсепян В. А., Сарпова М. В., Зотина Е. Н., Минаева Н. В., Загоскина Т. П. **Прогностическое значение содержания клеток с изолированной интерстициальной делецией 13q14 при хроническом лимфолейкозе** 188

Сёмочкин С. В., Желнова Е. И., Юрова Е. В., Гаглоева Д. Э., Архипова Н. В., Толстых Т. Н., Мисюрина Е. Н. **Эффективность лечения впервые диагностированной множественной миеломы, осложненной диализ-зависимой почечной недостаточностью** 193

Сергеева Л. Г., Целоусова О. М., Васкина Е. А., Татаурова И. П. **Заболеваемость острыми лейкозами детского населения Кировской области за период 2002-2016 гг.** 197

Федоровская Н. С., Росин В. А., Дьяконов Д. А., Минаева Н. В., Лагунова О. Р., Самарина С. В., Целоусова О. М., Парамонов И. В. **Анализ структуры и частоты встречаемости неходжкинских лимфом в Кировской области** 206

Чеботкевич В. Н., Бессмельцев С. С., Киселева Е. Е., Кайтанджан Е. И., Стижак Н. П., Бурылев В. В. **Клинические и этиологические особенности вирусно-бактериальных инфекционных осложнений у больных гемобластозами** 211

Черепанова В. В, Курыщева М. А. **Острые порфирии** 216

Вопросы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Коряковцева Т. А. **Анализ посттрансплантационного химеризма на основании исследования антигенов эритроцитов** 224

Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Киселева А. Н. **Определение посттрансплантационного химеризма при анализе генов F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR** 229

Исаева Н. В., Утемов С. В., Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Костяев А. А., Шерстнев Ф. С. **Результаты оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконцентратах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки** 234

Логинова М. А., Парамонов И. В., Рылов А. В. **Новый аллель локуса HLA-C, HLA-C*06:02:48, выявленный у бурят** 241

Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Исаева Н. В., Утемов С. В. **Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: свойства, источники получения и перспективы применения в трансплантологии** 245

Хоробрых М. Н., Минаева Н. В., Зорина Н. А., Лучинин А. С., Лагунова О. Р., Докшина И. А., Исаева Н. В., Утемов С. В., Ветошкин К. А., Парамонов И. В. **Эффективность режима кондиционирования высокими дозами мелфалана с бортезомибом при аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с множественной миеломой** 252

УДК 577.352.4:612.111:57.043

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИКАЦИИ Ca^{2+}-АТФазы ЭРИТРОЦИТОВ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ НА РАЗНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Землянских Н. Г., Бабийчук Л. А.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков, Холодногорский район, Переяславская улица, 23)

STUDY OF THE MODIFICATION OF ERYTHROCYTE Ca^{2+}-ATPase BY POLYETHYLENE GLYCOLE WITH DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS

Zemlianskykh N. G., Babijchuk L. A.
Institute for problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov, Ukraine
(Kharkov,Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)
E-mail: nzemliansky@gmail.com

Изучение модифицирующего действие полиэтиленгликоля м.м. 1500 на Ca^{2+}-АТФазу в замкнутых тенях и сапонин-перфорированных эритроцитах показало резкое снижение Ca^{2+}-АТФазной активности. Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах вследствие торможения каталитической активности Ca^{2+}-АТФазы может влиять на стабильность клеток в стрессовых условиях криоконсервирования.

Ключевые слова: *Ca^{2+}-АТФаза, мембрана, эритроцит, криопротектор, полиэтиленгликоль*

A study of the modifying action of polyethylene glycol m.w. 1500 on Ca^{2+}-ATPase in sealed ghosts and saponin-perforated erythrocytes showed a sharp decrease in Ca^{2+}-ATPase activity. An increase in the level of intracellular Ca^{2+} in erythrocytes due to inhibition of the catalytic activity of Ca^{2+}-ATPase can affect the stability of cells under stressful conditions of cryopreservation.

Keywords: *Ca^{2+}-ATPase, membrane, erythrocyte, cryoprotectant, polyethylene glycol*

Для защиты клеток от разрушения в процессе криоконсервирования используют различные органические соединения, отличительной чертой которых является биосовместимость. Тем не менее, все криопротекторы в той или иной степени влияют на структуру и функции мембранных систем. Полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500), не проникающий в клетки, обеспечивает высокую сохранность эритроцитов человека в процессе криоконсервирования. Важная роль в поддержании стабильности клеток в стрессовых условиях принадлежит Ca^{2+}-АТФазе плазматической мембраны – единственной системе контроля внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах человека. Вместе с тем, результаты оценки действия криопротекторов на Ca^{2+}-АТФазу при использовании разных экспериментальных моделей не всегда идентичны. Например, ДМСО может усиливать активность изолированного очищенного фермента, выделенного из мембран эритроцитов [1]. Однако под влиянием ДМСО ингибируется кальмодулин-зависимая активность Ca^{2+}-АТФазы без изменения ее базовой функции в случае, если фермент находится в составе мембраны [2].

Следовательно, эффекты криопротекторных соединений на Ca^{2+}-АТФазу эритроцитов могут быть неоднозначными и затрагивают различные аспекты ее функциональной активности. В данной работе для исследования эффектов ПЭГ-1500 на активность Ca^{2+}-АТФазы в эритроцитах использовали две экспериментальные модели: Ca^{2+}-АТФазу в структуре изолированной мембраны (замкнутые тени эритроцитов) и сапонин-перфорированные клетки. Фермент в составе мембраны является адекватной моделью для изучения Ca^{2+}-АТФазы и позволяет исследовать различные аспекты ее функционирования в присутствии криопротекторов, близко к общей картине поведения данной системы в клетке. В частности, данная экспериментальная модель позволяет оценить действие криопротектора, если оно реализуется путем непосредственного влияния на структуру молекулы Ca^{2+}-АТФазы или опосредованно через влияние на структуру липидного бислоя. Вместе с тем, в нативной клетке контроль за активностью Ca^{2+} -АТФазы осуществляется более сложными путями и включает регуляцию ее работы различными эндогенными модуляторами, в том числе кальмодулином, протеинкиназами А и С, протеазами, кислыми фосфолипидами. Поэтому, сохранение всех компонентов внутриклеточного содержимого эритроцитов при перфорировании плазматических мембран сапонином требуется для того, чтобы получить доступ к активным центрам фермента и контролировать параметры среды при проведения ферментативной реакции гидролиза АТФ, а также дает еще одну дополнительную возможность для определения модификации активности Ca^{2+} -АТФазы полиэтиленгликолем.

Цель работы заключалась в определении модифицирующего действия ПЭГ-1500 на активность Ca^{2+}-АТФазы в эритроцитах на различных экспериментальных моделях: изолированных мембранах (замкнутых тенях) и сапонин-перфорированных клетках.

Материалы и методы. Объектом исследования служили эритроциты донорской крови, полученной из Центра службы крови г. Харькова. Выделение мембран эритроцитов и определение ферментативной активности Ca^{2+}-АТФазы в тенях эритроцитов, проводили согласно методическим описаниям [3]. Влияние ПЭГ-1500 на активность Са-АТФазы на модели сапонин-перфорированных клеток оценивали в соответствии с методическими описаниями [4]. Контролем служил раствор 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Результаты статистически обработаны с использованием программы Statgraphics plus 2.1 for Windows. Статистическую значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью множественного рангового теста Фишера.

Результаты и обсуждение. Модель реконструированных эритроцитов (замкнутых теней) позволяет оценить активность Ca^{2+}-АТФазы под влиянием экзоцеллюлярного соединения в условиях, предотвращающих его непосредственный контакт с цитоплазматическими доменами фермента, что соответствует экзоцеллюлярному характеру действия ПЭГ-1500 на

эритроциты человека. Недостаток данной модели связан с исключением эндогенных цитоплазматических регуляторов Ca^{2+}-АТФазной активности при получении фракции изолированных мембран. Сапонин-перфорированные эритроциты компенсируют этот недостаток. Однако, для оценки действия ПЭГ-1500 на Ca^{2+}-АТФазу в данной экспериментальной модели криопротектор необходимо удалить из среды до начала ферментативной реакции, чтобы он не мог контактировать с цитоплазматическими доменами Ca^{2+}-АТФазы, т.е., фактически, оцениваются последствия контакта ПЭГ-1500 с клетками.

Определение активности Ca^{2+}-АТФазы в замкнутых тенях эритроцитов в присутствии криопротектора показало, что при добавлении его в среду даже в небольших концентрациях наблюдается ингибирование активности Ca^{2+}-АТФазы (рис. 1). При высоких концентрациях полимера (20–30%), которые способны оказывать выраженное криопротекторное действие, было отмечено снижение скорости накопления конечного продукта гидролиза АТФ, осуществляемого Ca^{2+}-АТФазой (неорганического фосфата Pi) примерно в 3 раза.

Эксперименты с использованием сапонин-перфорированных эритроцитов были проведены только для 30% раствора ПЭГ-1500, который демонстрирует выраженный криопротекторный эффект. Инкубация эритроцитов с ПЭГ-1500 при 37^0C и 5^0C (рис.2) приводила к снижению активности Ca^{2+}-АТФазы почти в 2 раза независимо от температуры, при которой эритроциты инкубировались с ПЭГ-1500, в случае, если после удаления из среды криопротектора, реакция гидролиза АТФ проводилась при 37^0C. Однако, если после инкубации эритроцитов с ПЭГ-1500 при температуре 5^0C активность Ca^{2+}-АТФазы оценивать при той же температуре, то обнаруживается, что снижение температуры оказывает дополнительный ингибирующий эффект на Ca^{2+}-АТФазу. В этих условиях активность фермента была ниже в сравнении не только с контролем, но и с эритроцитами, инкубировавшимися с ПЭГ-1500 при 5^0C при последующей оценке функционирования Ca^{2+}-АТФазы при 37^0C.

Таким образом, исследование Ca^{2+}-АТФазной активности в эритроцитах на экспериментальных моделях замкнутых теней эритроцитов и перфорированных сапонином клетках выявило только одну тенденцию ее модификации экзоцеллюлярным криопротекторным соединением ПЭГ-1500, выражающуюся в снижении скорости накопления конечного продукта гидролизной реакции – неорганического фосфора. Поскольку способность Ca^{2+}-насоса транспортировать ионы Ca^{2+} определяется, прежде всего, его каталитической активностью, можно ожидать повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах, инкубированных в ПЭГ-содержащих растворах. Известно, что ионы Ca^{2+} обладают функцией вторичного мессенджера и могут играть важную роль в выживании клеток в стрессовых условиях [5], в том числе когда стрессовые факторы обусловлены процессом криоконсервирования.

Несмотря на то, что ПЭГ-1500 обеспечивает высокий уровень сохранности эритроцитов человека на этапе размораживания при переносе размороженных эритроцитов в физиологические условия отмечается развитие гемолиза, т.е., происходит дестабилизация клеток. Возможно, одной из причин нестабильности мембран эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500, является высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+}, обусловленная снижением активности Ca^{2+}-АТФазы на этапе инкубирования клеток с криопротектором перед замораживанием. Известно, что высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} может быть триггером апоптоза [6,7], который ведет к дестабилизации и гибели клеток.

Ингибирующее действие ПЭГ-1500 на Ca^{2+}-АТФазу в эритроцитах, очевидно, обусловлено физико-химическими свойствами данного полимера, который обладает амфифильными свойствами, оказывает дегидратирующее действие на макромолекулы и изменяет поверхностный потенциал раствора [8,9]. Вследствие изменений свойств среды может снижаться текучесть мембран, происходить дегидратация липидов [10,11]. По-видимому, структурные изменения мембраны эритроцитов, обусловленные криопротектором, являются достаточно сложными и устойчивыми, и даже присутствие в среде ферментативной реакции эндогенных модуляторов Ca^{2+}-АТФазы, способных оказывать стимулирующее действие, не может преодолеть ограничения, наложенные модифицированным мембранным окружением, на ее функционирование в мембранной системе.

Список литературы

1. Benaim, G. Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+}- ATPase by organic solvents / G. Benaim, L. de Meis // FEBS Lett. – 1989. – Vol. 244, №2. – P. 484–486.

2. Inhibition of calmodulin-stimulated (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase activity by dimethyl sulfoxide / E.J. McConnell, M.J. Wagoner, C.E. Keenan, B.U. Raess // Biochem Pharmacol. – 1999. – Vol. 57, №1. – P. 39-44.

3. Землянских, Н.Г. Активность Ca^{2+}-АТФазы эритроцитов человека в гипертонических средах при низкой и физиологической температуре / Н.Г. Землянских, М.В. Хоменко // Биологические мембраны. – 2006. – Т.23, №6. – С. 484–492.

4. Землянских, Н.Г. Изменения активности Ca^{2+}-АТФазы эритроцитов под влиянием пэг-1500 и низких температур / Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук // Цитология. – 2016. – Т.58, №12. – С. 964–970.

5. Calcium in red blood cells – a perilous balance / A. Bogdanova, A. Makhro, J. Wang [et al.]. - // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14, №5. – P. 9848–9872.

6. Lang E. Killing me softly – suicidal erythrocyte death / E. Lang, S.M. Qadri, F. Lang // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 44, №8 – P.1236–1243.

7. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death / F. Lang, S. M. Huber, I. Szabo, E. Gulbins // Arch. Biochem. Biophys.– 2007. – Vol. 462, №2. – 189–194.

8. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media / J. Chen, S.K. Spear, J. G. Huddleston, R. D. Rogers // Green Chem. – 2005. – Vol. 7, №2. – P. 64–82.

9. Effect of poly (ethylene glycol) on the polarity of aqueous solutions and on the structure of vesicle membranes / A. Herrmann, L. Pratsch, K. Arnold, G. Lassmann // Biochim. biophys. acta. – 1983. – Vol. 733, №1 – P. 87– 94.

10. Lehtonen, J.Y.A. Changes in the lipid dynamics of liposomal membranes induced by PEG / J.Y.A. Lehtonen, P.K.J. Kinnunen // Biophys. J. – 1994. – Vol. 66, №6 – P. 1981–1990.

11. Lehtonen, J. Y. Poly (ethylene glycol) - induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes / J. Y. Lehtonen, P. K. Kinnunen // Biophys J. – 1995. – Vol. 68, №2. – P. 525–535.