

Кинетические характеристики Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии ПЭО-1500

Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук, А.Ю. Никольченко, В.П. Тягилева
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Kinetic Characteristics of Ca^{2+} -ATPase of Erythrocytes in PEO-1500 Presence

ZEMLYANSKIKH N.G., BABIYCHUK L.A., NIKOLCHENKO A.YU., TYAGILEVA V.P.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

В работе установлено, что экзоцеллюлярный криопротектор ПЭО-1500 ингибирует активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов. Кинетический анализ показал, что торможение работы фермента связано с изменениями V_{\max} , но не K_m для низкоаффинного каталитического центра Ca^{2+} -АТФазы. Высокоаффинный центр Ca^{2+} -АТФазы не модифицируется под влиянием ПЭО-1500. Присутствие в среде криопротектора снижает чувствительность ферментативной реакции гидролиза АТФ к ионам Ca^{2+} , в результате чего работа Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в меньшей степени активируется в диапазоне низких концентраций Ca^{2+} и в большей тормозится в области высоких концентраций данного иона в сравнении с нативными эритроцитами. Полученные данные позволяют предположить, что под влиянием ПЭО-1500 ионотранспортирующая функция Ca^{2+} -АТФазы может подавляться, и эффективность работы Са-насоса будет падать. Очевидно, ингибирование активности Ca^{2+} -АТФазы вызвано модификацией физико-химических характеристик плазматической мембраны под влиянием ПЭО-1500.

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

У роботі встановлено, що екзоцелюлярний криопротектор ПЕО-1500 інгібує активність Ca^{2+} -АТФазы еритроцитів. Кінетичний аналіз показав, що гальмування роботи ферменту пов'язано зі змінами V_{\max} , але не K_m для низкоаффінного каталітичного центру Ca^{2+} -АТФазы. Высокоаффінний центр Ca^{2+} -АТФазы не модифікується під впливом ПЕО-1500. Присутність у середовищі криопротектора знижує чутливість ферментативної реакції гідролізу АТФ до іонів Ca^{2+} , у результаті чого функціонування Ca^{2+} -АТФазы еритроцитів у меншій мірі активується в діапазоні низьких концентрацій Ca^{2+} і в більшій гальмується у межах високих концентрацій даного іона у порівнянні з нативними еритроцитами. Отримані дані дозволяють припустити, що під впливом ПЕО-1500 іонотранспортуєча функція Ca^{2+} -АТФазы може пригнічуватись, і ефективність роботи Са-насоса буде падати. Очевидно, інгібування активності Ca^{2+} -АТФазы викликано модифікацією фізико-хімічних характеристик плазматичної мембрани під впливом ПЕО-1500.

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

In the work it has been established, that the exocellular cryoprotectant PEO-1500 inhibits the activity of Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes. Kinetic analysis showed that the inhibition of enzyme activity was related to the V_{\max} alteration, but not to K_m for catalytic center with a low affinity of Ca^{2+} -ATPase. The highly affinic center of Ca^{2+} -ATPase was not modified under PEO-1500 effect. The presence of cryoprotectant in the medium reduces the sensitivity of enzyme response of ATP hydrolysis to Ca^{2+} ions, as the result the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase functioning is activated in a lesser extent within the range of Ca^{2+} low concentrations and is inhibited in a greater extent for a high concentration range of this ion in comparison with the native erythrocytes. These data allow to suggest, that under PEO-1500 effect the Ca^{2+} -ATPase ion-transporting function can be suppressed, and the efficiency of Ca-pump activity will decrease. The inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity is evidently caused by modifying the physical and chemical characteristics of plasma membrane under PEO-1500 effect.

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

Поддержание высокого градиента Ca^{2+} между цитоплазмой и внеклеточной средой обеспечивает Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов. Роль этого фермента исключительно важна, поскольку в клетке существует ряд Ca^{2+} -зависимых ферментов, активация которых приводит к изменению структурно-функционального состояния белков цитоскелета, липидных компонентов плазматической мембраны, модификации функционирования систем активного транспорта [1, 4]. Все это может повлиять на стабильность клетки к экстремальным факторам внешнего воздействия.

Адрес для корреспонденции: Землянских Н.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes provides the maintaining of a high Ca^{2+} gradient between cytoplasm and extracellular medium. The role of this enzyme is utterly important, since there are the series of Ca^{2+} -dependent enzymes in a cell, which activation results in a change of structural and functional state of cytoskeletal proteins, lipid components of plasma membrane, modification of active transport system functioning [1, 4]. All this can affect the cell resistance to the extreme factors of environmental effect.

Our investigations revealed, that the exocellular cryoprotectant PEO-1500 was capable of inhibiting the

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.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

В наших исследованиях было обнаружено, что экзоцеллюлярный криопротектор ПЭО-1500 способен ингибировать активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов. Чтобы понять механизм ингибирующего влияния ПЭО-1500 на активность Ca^{2+} -АТФазы необходимо определить основные характеристики ее работы (V_{\max} и K_m) в присутствии криопротектора. Поскольку существенным моментом функционирования данной ионтранспортующей системы является ее чувствительность к активирующему действию ионов Ca^{2+} , анализ изменений работы Ca^{2+} -АТФазы в зависимости от концентрации кальция при воздействии на клетки ПЭО-1500 – важное условие, позволяющее сформировать представление о механизме действия ПЭО на данную биологическую систему.

Цель нашего исследования – проведение кинетического анализа активности Ca^{2+} -АТФазы и изучение особенностей регуляции ее работы различными концентрациями Ca^{2+} при воздействии на эритроциты экзоцеллюлярного криопротектора ПЭО-1500.

Материалы и методы

В работе использовали реактивы: Trizma base (Sigma), ATP disodium (Sigma), HEPES, EGTA (Serva), CaCl_2 (Sigma), Saponin (Fluka), KCl, $\text{MgCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 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 проводились на 3-5-е сутки после забора крови. В течение всего срока хранения кровь находилась при температуре 2-4°C.

Эритроциты перед опытом осаждали центрифугированием при 900g (центрифуга ОПН-8), плазму и лейкоцитарный слой удаляли. Эритроциты трижды промывали 3-4-кратными объемами среды А (150 mM NaCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,4). После этого их инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии криопротектора ПЭО-1500 или в среде А. В работе использовали 30%-й раствор ПЭО-1500, приготовленный на основе среды А, который добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1 по объему. После инкубации эритроциты осаждали при 600g и оценивали активность Ca^{2+} -АТФазы по методу, описанному в [5]. Аликвоты инкубированных клеток добавляли в среду, содержащую 125 mM KCl, 0,25 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 20 mM Tris (pH 7,4), 0,04%-й сапонин, 1 mM EGTA и варьирующие концентрации АТФ (10^{-5} - 10^{-3} M), при заданной концентрации CaCl_2 1,1 mM или его варьирующей концентрации (10^{-5} - 10^{-3} M) при концентрации АТФ 1 mM. Активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов оценивали по

Ca^{2+} -АТФазе эритроцитами. In order to understand the mechanism of PEO-1500 inhibiting effect on Ca^{2+} -АТФазе, it is necessary to determine the main characteristics of its activity (V_{\max} and K_m) at the presence of cryoprotectant. Since a significant moment of this ion-transporting system functioning is its sensitivity to an activating effect of Ca^{2+} ions, the analysis of changes in Ca^{2+} -АТФазе activity depending on calcium concentration, when affecting cells with PEO-1500, is an important condition, enable to create the notion about PEO action mechanism on this biological system.

The aim of our investigation was to carry-out the kinetic analysis of Ca^{2+} -АТФазе activity and to study the peculiarities for its functioning regulation by various Ca^{2+} concentrations when affecting erythrocytes with an exocellular cryoprotectant PEO-1500.

Materials and methods

The following reagents were used in the work: Trizma base (Sigma), ATP disodium (Sigma), HEPES, EGTA (Serva), CaCl_2 (Sigma), Saponin (Fluka), KCl, $\text{MgCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$ and other reagents of Ukrainian and Russian production (chemically pure and especially pure).

The erythrocytes of the II(A) donor blood group of men, procured in “Glygicir” preservative, served as an object for investigation. The investigation was performed to the 3rd-5th day following blood procurement. Within the all storage term the blood was stored under 2-4°C.

Before an experiment the erythrocytes were precipitated at 900 g (OPN-8 centrifuge), the plasma and leukocyte layers were removed. Erythrocytes were thrice washed-out with 3-4-fold volumes of the medium А (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Afterwards they were incubated at 37°C for 30 min with PEO-1500 cryoprotectant or the medium А. PEO-1500 30% solution, based on the medium А, which was added to erythrocytes in 1:1 ratio (v/v), was used in the work. Following incubation the erythrocytes were precipitated at 600 g and the Ca^{2+} -АТФазе activity was evaluated using the method, described in the paper [5]. The aliquots of incubated cells were added into the medium, containing 125 mM KCl, 0.25 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 20 mM Tris (pH 7.4), 0.04% saponin, 1mM EGTA and varying concentrations of ATP (10^{-5} - 10^{-3} M), under a fixed CaCl_2 concentration of 1.1 mM or its varying concentration (10^{-5} - 10^{-3} M) at the ATP concentration of 1 mM. The Ca^{2+} -АТФазе erythrocyte activity was estimated by difference in accumulation of inorganic phosphate in the samples with Ca^{2+} and without it (the samples contained only EGTA). The phosphate accumulation during the process of enzyme hydrolysis occurred within 20 min at 37°C, afterwards the reaction was stopped

разности накопления неорганического фосфата в пробах, содержащих Ca^{2+} и не содержащих его (пробы содержали только EGTA). Накопление фосфатов в процессе ферментативного гидролиза происходило в течение 20 мин при 37°C , после чего реакцию останавливали добавлением холодного раствора ТХУ до конечной концентрации в среде 5%.

Неорганический фосфор (P_i) в пробах определяли по методу, описанному в [11]. 100 мкл надосадочной жидкости (после осаждения белков) добавляли к 2 мл 1,5 М ацетатного буфера ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 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 6,75 мМ SnCl_2 . Пробы колориметрировали при длине волны 660 нм на спектрофотометре Ломо СФ-46. Калибровка была линейной до 10 мкг неорганического фосфора в пробе.

Результаты и обсуждение

Исследование механизма ферментативной реакции кинетическими методами основано на установлении функциональной зависимости скорости реакции от различных факторов: концентрации субстрата, воздействия модификаторов и т.д. Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов осуществляет транспорт Ca^{2+} против его электрохимического градиента, и ионы Ca^{2+} являются одним из основных лигандов, необходимых для активации каталитической реакции в данной транспортной системе. Изменения концентрации Ca^{2+} в клетке модифицируют скорость ферментативной реакции [1, 6]. Следовательно, роль ионов Ca^{2+} в отношении Ca^{2+} -АТФазы двояка: с одной стороны, они необходимы для активации фермента, осуществляющего гидролиз АТФ, с другой – ионы Ca^{2+} транспортируются Ca^{2+} -АТФазой из клетки во внешнюю среду. Изучение сопряжения транспорта Ca^{2+} с АТФазной активностью позволило установить, что в обоих случаях работает один и тот же центр, связывание с которым кальция инициирует образование фосфофермента в результате гидролиза АТФ и перемещение связавшихся ионов через плазматическую мембрану [9]. Влияние Ca^{2+} на активность ферментативного гидролиза АТФ характеризуется активированием скорости реакции при небольших его концентрациях в среде, а избыток ионов Ca^{2+} ведет к ингибированию работы Ca^{2+} -АТФазы. На рис. 1 представлены данные по модифицирующему влиянию ПЭО-1500 на зависимость ферментативной активности Ca^{2+} -АТФазы от концентрации ионов Ca^{2+} в среде. Установлено, что чувствительность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, инкубированных с ПЭО-1500, к активирующему

by adding a cold solution of trichloroacetic acid up to the 5% final concentration in the medium .

Inorganic phosphorus (P) in the samples was determined using the method, described in the paper [11]: 100 μl of supernatant (after protein precipitation) were added to 2 ml of 1.5 M acetate buffer ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$, pH 4.3), containing 3.7% of formaldehyde and 10% of ethanol. Afterwards to each sample one added in series by 0.1 ml of 2% solution of ammonium molybdate and by 0.2 ml of 6.75 mM of SnCl_2 .

The colorimetry of samples was done at the wavelength of 660 nm by LOMO SP-46 spectrophotometer . The calibration was linear up to 10 μg of inorganic phosphorus in a sample.

Results and discussion

The investigation of the mechanism of enzyme reaction using the kinetic methods is based on the establishment of functional dependency of the reaction rate on different factors such as: the substrate concentration, effect of modifiers etc. Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes realises the Ca^{2+} transport against its chemical gradient, and the Ca^{2+} ions are once of the main ligands, necessary for activating the catalytic reactions in this transport system. The changes in Ca^{2+} concentration in a cell modify the enzyme reaction rate [1, 6]. Consequently, the role of Ca^{2+} ions in respect to Ca^{2+} -ATPase is double: on one hand, they are necessary for the enzyme activation, performing the ATP hydrolysis, on other hand, the Ca^{2+} ions are transported by Ca^{2+} -ATPase out of a cells into the environment. The study of conjugation of Ca^{2+} transport with ATPase activity allowed to establish, that in both cases the same center worked, the calcium binding with which initiated the phosphoenzyme formation as a result of ATP hydrolysis and the transition of the bound ions through plasmatic membrane [9]. The Ca^{2+} effect on the activity of ATP enzyme hydrolysis is characterised by the activating of the reaction rate under its small concentrations in the medium, but the Ca^{2+} ion excess results in the inhibition of Ca^{2+} -ATPase work. The Fig.1 presents the data on the PEO-1500 modifying effect on the dependency of the Ca^{2+} -ATPase enzyme activity on Ca^{2+} ion concentration in the medium. It was established that the Ca^{2+} -ATPase sensitivity of PEO-1500 incubated erythrocytes to an activating effect of Ca^{2+} ions was lower than in the control. Correspondingly the Ca^{2+} surplus inhibits in a greater extent a Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocytes, subjected to the PEO-1500 effect, in comparison with the native cells. We can suppose, that a decrease in Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocytes in the PEO-1500 presence is explained by the reduction of the enzyme sensitivity to the main ligand: Ca^{2+} ions. The results obtained allow to suggest, that under these experimental conditions the efficiency of the Ca^{2+} -transporting

влиянию ионов Ca^{2+} ниже, чем в контроле. Соответственно, и избыток Ca^{2+} в большей степени ингибирует Ca^{2+} -АТФазную активность эритроцитов, подвергшихся воздействию ПЭО-1500, по сравнению с нативными клетками. Можно предположить, что снижение активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии ПЭО-1500 объясняется снижением чувствительности фермента к основному лиганду – ионам Ca^{2+} . Полученные результаты позволяют высказать предположение, что в данных экспериментальных условиях эффективность Ca^{2+} -транспортирующей функции, осуществляемой Ca^{2+} -АТФазой, очевидно, также будет ниже, чем в нативных эритроцитах. Известно, что соотношение $\text{Ca}/\text{АТФ}$, определяющее количество ионов Ca^{2+} , которые транспортируются из клетки при расщеплении одной молекулы АТФ Ca^{2+} -АТФазой эритроцитов, составляет примерно 1. По-видимому, в эритроцитах, инкубированных с ПЭО-1500, возможны снижение этого соотношения и падение эффективности работы данной транспортной системы.

Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов может фосфорилироваться в присутствии только ионов Ca^{2+} (тогда как фосфорилирование Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума нуждается в активации фермента ионами Ca^{2+} и Mg^{2+}) [12]. Образование фосфофермента является равновесной реакцией, затем следует Mg^{2+} -зависимый эндергонический конформационный переход $\text{E1}\sim\text{P}\rightarrow\text{E2}\sim\text{P}$. Стадия дефосфорилирования Ca^{2+} -АТФазы, связанная с выбросом Ca^{2+} из эритроцитов, дополнительно активируется высокими концентрациями АТФ (или Mg^{2+} -АТФ). Эта активация обусловлена наличием второго низкоаффинного реакционного центра фермента. Именно наличием второй K_m в области концентрации АТФ свыше 10^{-4} М и объясняется тот факт, что Ca^{2+} -АТФаза не подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен и демонстрирует дополнительную активацию в присутствии высоких концентраций субстрата. Следует отметить, что эта особенность проявляется только в отношении АТФ, тогда как другие субстраты, способные фосфорилировать Ca^{2+} -АТФазу, и полностью подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен [12].

Мы проанализировали влияние ПЭО-1500 на кинетику гидролиза АТФ Ca^{2+} -АТФазой. На рис. 2 видно, что на первом этапе работы фермента, когда гидролиз АТФ осуществляется с участием высокоаффинного реакционного центра фермента, модулирующее влияние ПЭО-1500 на кинетику ферментативной реакции не обнаружено, поскольку этот участок на графике совпадает с кинетическими характеристиками Ca^{2+} -АТФазы нативных эритроцитов. Различия проявляются в области высоких концентраций АТФ и мы можем видеть (рис. 2), что Ca^{2+} -АТФаза эритроцитов в присутствии ПЭО-

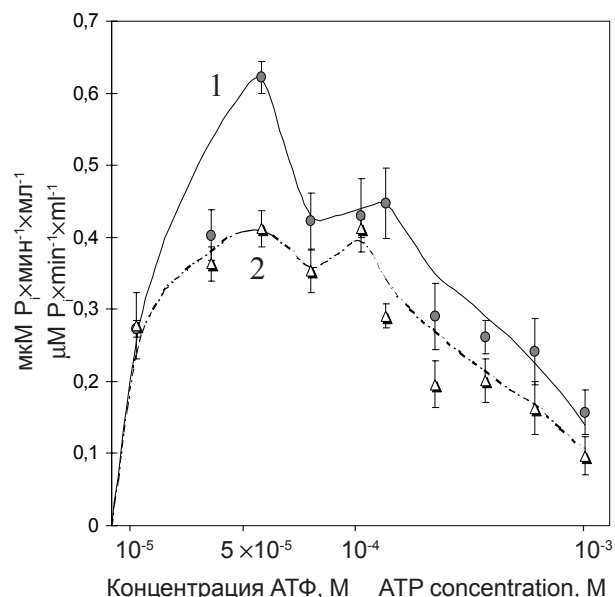


Рис. 1. Модификация активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в зависимости от концентрации Ca^{2+} в среде под влиянием экзоцеллюлярного криопротектора ПЭО-1500: 1 – контроль; 2 – ПЭО.

Fig. 1. Modification of Ca^{2+} -ATPase erythrocyte activity depending on Ca^{2+} concentration in the medium under exocellular cryoprotectant PEO-1500 effect: 1 – control; 2 – PEO.

function will be obviously lower, than in native erythrocytes as well. It is known, that the $\text{Ca}/\text{АТФ}$ ratio, determining the number of Ca^{2+} ions, transported out of a cell during the disintegration of one ATP molecule by Ca^{2+} -ATPase, makes approximately 1. In PEO-1500 incubated erythrocytes a decrease in this ratio is evidently possible and the activity efficiency of this transport system will decline.

The Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes can be phosphorylated in the presence of only Ca^{2+} ions (whereas the Ca^{2+} -ATPase phosphorylation of sarcoplasmic reticulum needs the enzyme activation by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions) [12]. The phosphoenzyme formation is an equilibrium reaction, then the Mg^{2+} -dependent endergonic conformational transfer of $\text{E1}\sim\text{P}\rightarrow\text{E2}\sim\text{P}$ follows. The stage of the Ca^{2+} -ATPase dephosphorylation, related to the Ca^{2+} release out of erythrocytes, is additionally activated by high concentrations of ATP (or Mg^{2+} -ATP). This activation is stipulated by the presence of the second low-affinic reaction center of the enzyme. Namely the presence of the second K_m within the ATP concentration range higher than 10^{-4} M, explains the fact, that Ca^{2+} -ATPase is not submitted to the Michaelis-Menten kinetics and demonstrates an additional activation under high concentrations of a substrate. It should be noted, that this peculiarity is manifested only in ATP ratio, whereas the other substrates are capable to phosphorylate Ca^{2+} -ATPase and to be completely submitted to the Michaelis-Menten kinetics [12].

We analysed the PEO-1500 effect on the hydrolysis kinetics by Ca^{2+} -ATPase. The Fig. 2 shows, that at

1500 функционирует медленнее по сравнению с контролем. Эффективность работы фермента оценивается двумя основными параметрами: максимальной скоростью реакции V_{max} и константой Михаэлиса-Ментен K_m , отражающей меру сродства фермента к субстрату. Чтобы ответить на вопрос, с чем связано замедление работы Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах в присутствии ПЭО-1500, воспользовались методом Лайнуивера-Берка для нахождения V_{max} и K_m на участке, соответствующем работе низкоаффинного центра фермента, где обнаруживаются различия. Было установлено, что сродство фермента к субстрату, характеризуемое K_m , не изменяется в присутствии ПЭО-1500, а V_{max} ферментативной реакции под влиянием ПЭО-1500 снижается. Из расчетных данных величина V_{max} , определенная для Ca^{2+} -АТФазы (для конкретной модели изучения Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах с плазматической мембраной, перфорированной детергентом сапонином) в нативных эритроцитах, составляет $0,717 \mu M P_i \times \text{мин}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$, а в эритроцитах, инкубированных с ПЭО-1500 – $0,480 \mu M P_i \times \text{мин}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$. Таким образом, мы можем сказать, что ПЭО-1500 ингибирует активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов по неконкурентному механизму (K_m не изменена, V_{max} уменьшена). Снижение V_{max} Ca^{2+} -АТФазы при активации фермента высокими концентрациями АТФ, происходящее под влиянием ПЭО-1500, может иметь важное значение для осуществления Ca^{2+} -транспортирующей функции, поскольку именно этап, связанный с выбросом Ca^{2+} из клетки, активируется высокими концентрациями АТФ [12, 1].

Таким образом, ингибирующее влияние ПЭО-1500 на активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов проявляется в снижении чувствительности фермента к активирующему влиянию ионов Ca^{2+} (начальный этап цикла работы фермента) и снижении V_{max} при высоких концентрациях субстрата АТФ (этап, связанный с выбросом Ca^{2+} во внеклеточную среду). Это позволяет высказать предположение, что эффективность транспортирующей функции будет также снижаться в присутствии криопротектора, а результатом этого может стать повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле до значений, необходимых для активации Са-зависимых ферментов, участвующих в структурно-метаболических перестройках клетки. Повидимому, в таких условиях происходит стабилизация эритроцитов к действию экстремальных факторов низкотемпературного консервирования.

Полученные данные дают определенное представление о характере ингибирующего влияния ПЭО-1500 на работу Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов, однако о механизме (или причинах) ингибирования мы не можем сказать столь определенно. Возмож-

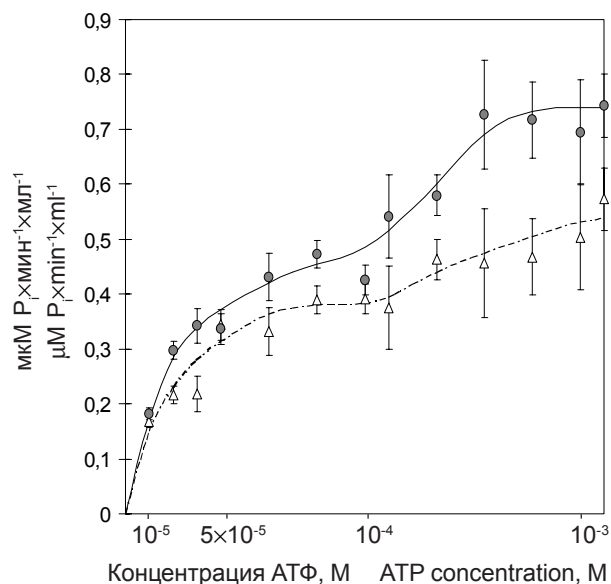


Рис. 2. Модификация активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в зависимости от концентрации Ca^{2+} в среде под влиянием экзоцеллюлярного криопротектора ПЭО-1500. 1 – контроль, 2 – ПЭО.

Fig. 2. Modification of Ca^{2+} -ATPase erythrocyte activity with PEO-1500 cryoprotectant when varying the substrate concentration. 1 – control, 2 – PEO.

the first stage of the enzyme activity, when ATP hydrolysis is realised with the participation of a highly affinic reaction centre of the enzyme, the PEO-1500 modulating effect on the kinetics of enzyme reaction was not revealed, since this site in the plot coincided with the Ca^{2+} -ATPase kinetic characteristics of native erythrocytes. The differences are manifested in the area of high ATP concentrations and we can see (Fig. 2), that Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes in the presence of PEO-1500 acts slower in comparison with the control. The efficiency of the enzyme activity is estimated by two main parameters: the maximum rate of reaction V_{max} and the Michaelis-Menten constant K_m , reflecting the affinity degree of the enzyme to substrate. In order to answer the question what the inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity in erythrocytes at the PEO-1500 presence is related to, we used the method of double reciprocal plot for V_{max} and K_m finding at the site, corresponding to the activity of the low-affinic enzyme centre, where the differences are revealed. It was established, that the enzyme affinity to the substrate, characterised as K_m , did not change in the PEO-1500 presence, and V_{max} of enzyme reaction under PEO-1500 effect decreased. With the calculation data the V_{max} value, determined for Ca^{2+} -ATPase (for specific model of Ca^{2+} -ATPase study in the erythrocytes with plasmatic membrane, perforated with saponine detergent) in native erythrocytes makes $0.717 \mu M P_i \times \text{мин}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$, but in the erythrocytes, incubated with PEO-1500 it does $0.480 \mu M P_i \times \text{мин}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$. Thus, we can say, that PEO-1500 inhibits the Ca^{2+} -ATPase

ны несколько предположений, объясняющих влияние непроницающего криопротектора на Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов. Прежде всего, ПЭО-1500, адсорбируясь на поверхности плазматической мембраны, способен нарушить структуру гидратных оболочек молекул, входящих в ее состав, в том числе и выступающего на наружной поверхности мембраны участка Ca^{2+} -АТФазы [2, 3, 7]. Снижение доступности воды к молекуле фермента может привести к снижению скорости работы данной транспортной системы [14].

ПЭО-1500 обладает значительной гидрофобностью и может проникать в гидрофобные зоны плазматической мембраны при определенных обстоятельствах, что ведет к нарушению структурной упаковки жирнокислотных радикалов фосфолипидов и изменению свойств этой области плазматической мембраны [7, 10, 13]. Ca^{2+} -АТФаза является липидзависимым ферментом. Поэтому нарушения липидного бислоя мембраны эритроцитов при взаимодействии с ПЭО-1500 могут повлиять на Ca^{2+} -АТФазную активность [1].

Поскольку ПЭО-1500 влияет на различные свойства плазматической мембраны, то можно предположить, что его ингибирующий эффект на Ca^{2+} -АТФазу эритроцитов является суммирующим результатом модификации физико-химических характеристик мембраны, вызванных ПЭО-1500.

Выводы

Экзоцеллюлярный криопротектор ПЭО-1500 ингибирует активность Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов. Кинетический анализ показал, что торможение работы фермента связано с изменениями V_{\max} , но не K_m для низкоаффинного каталитического центра Ca^{2+} -АТФазы. Присутствие в среде криопротектора снижает чувствительность ферментативной реакции гидролиза АТФ к ионам Ca^{2+} . Полученные данные позволяют предположить, что под влиянием ПЭО-1500 ионотранспортирующая функция Ca^{2+} -АТФазы может подавляться, и эффективность работы Са-насоса будет падать.

Литература

1. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов.— М.: Изд. Моск. ун-та, 1985. — 208 с.
2. Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М. Барьерные свойства биомембран при низких температурах.— Киев: Наук. думка, 1988.— 208с.
3. 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.
4. Орлов С.Н. Кальмодулин // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии.— М., 1987.— 404 с.
5. Покудин Н.И., Петруняк В.В., Орлов С.Н. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в

erythrocyte activity by a noncompetitive mechanism (K_m is without changes, V_{\max} is decreased). A decrease in V_{\max} of Ca^{2+} -ATPase at the enzyme activation by high ATP concentrations, occurring under PEO-1500 effect, can be important for realising the Ca^{2+} -transporting function, because it is this stage, relating to the Ca^{2+} release out of a cell, is activated by high ATP concentrations [12, 1].

Thus, the PEO-1500 inhibiting effect on the Ca^{2+} -ATPase erythrocyte activity is manifested in a decrease in the enzyme sensitivity to an activating effect of Ca^{2+} ions (initial stage of the enzyme activity cycle) and the V_{\max} decrease under high concentrations of ATP substrate (the stage, related to Ca^{2+} release into an extracellular medium). This allows to suggest, that the efficiency of a transporting function will also decrease in the presence of cryoprotectant, and this can result in an increase of Ca^{2+} concentration in cytosol up to the values, necessary for activation of Ca-dependent enzymes, participating in structural and metabolic cell rearrangements. It is probable that under such conditions the erythrocyte stabilisation to the effect of the low temperature preservation extreme factors occurs.

The data obtained provide a certain notion about the character of the PEO-1500 inhibiting effect on the Ca^{2+} -ATPase erythrocyte activity, however we can not speak very definitely about the mechanism (or causes) of inhibition. Several suppositions, explaining the effect of a non-penetrating cryoprotectant on Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes, are possible. First of all, PEO-1500, being absorbed on the surface of plasmatic membrane, is capable of impairing the structure of hydrate layer of molecules, being its part, including the protruding Ca^{2+} -ATPase site on the external membrane surface [2, 3, 7]. A decrease in water accessibility to the enzyme molecule can result in a decrease in the activity rate of this transport system [14].

PEO-1500 has a considerable hydrophobicity and can penetrate into hydrophobic zones of plasmatic membranes under certain circumstances, that results in a disorder of structural package of the phospholipid fat acid radicals and in a change of properties for this area of plasmatic membrane [7, 10, 13]. Ca^{2+} -ATPase is a lipid-dependent enzyme. Therefore, the disorders in a lipid bilayer of erythrocyte membrane during interaction with PEO-1500 can affect the Ca^{2+} -ATPase activity [1].

Since PEO-1500 affects different properties of plasmatic membrane, we can suppose, that its inhibiting effect on the Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes is a total result of modification of physical and chemical characteristics of a membrane, caused by PEO-1500.

Conclusions

Exocellular cryoprotectant PEO-1500 inhibits the Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocytes and the kinetic

эритроцитах *in vivo* // Биохимия.– 1988.– Т.53, №5.– С. 753-758.

6. Рыбина В.В., Еленская И.А., Каймачников Н.П. Регуляция активности Ca^{2+} -АТФазы ионами Ca^{2+} и кальмодулином в эритроцитах человека при различном времени хранения // Биол. мембраны.– 2001.– 18, №4.– С. 287-293.
7. Boni L.T., Stewart T.P., Alderfer J.L., Nui S.W. Lipid-polyethylen glycol interaction: II Formation of defects in bilayers // J. Membrane Biol.– 1981.– Vol.62, N1-2.– P. 71-77.
8. Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme // FASEB J.– 1994.– N8.– P. 993-1002.
9. Haynes D.H. Mechanism of Ca^{2+} transport by Ca, Mg-ATPase pump: analysis of major state and pathways // Amer. J. Physiol.– 1983.– Vol.244.– P. G3-G12.
10. Morgan C.G., Thomas E.W., Yianni Y.P. The use of fluorescence energy transfer to distinguish between polyethylene glycol induced aggregation and fusion of phospholipid vesicle // BBA.– 1983.– Vol.782, N3.– P. 356-362
11. Rathbum 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
12. Schatzmann H.J. The red cell calcium pump // Ann. Rev. Physiol.– 1983.– Vol.45.– P. 303-312.
13. Wojcieszyn J.W., Schlegel R.A., Lumley-Sapans I.K. et al. Studies on the mechanism of polyethylene glycol – mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes // J. Cell. Biol.– 1983.– Vol.96, N1.– P. 151-159.

Поступила 29.10.2003

analysis demonstrated, that the inhibiting of the enzyme activity was related to the changes in V_{\max} , but not K_m for low-affine catalytic center of Ca^{2+} -ATPase. The cryoprotectant presence in the medium reduces the sensitivity of enzyme reaction of ATP hydrolysis to Ca^{2+} ions. The data obtained allow to suppose, that under PEO-1500 effect the Ca^{2+} -ATPase ion-transporting function can be suppressed and the efficiency of Ca-pump activity will decrease.

References

1. Boldyrev A.A. Biological membranes and ion transport.– Moscow, 1985.– 208 p.
2. Gulevsky A.K., Bondarenko V.A., Belous A.M. Barrier properties of biomembranes under low temperatures.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 208 p.
3. 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.
4. Orlov S.N. Calmodulin // Itogi nauki i tekhniki. General problems of physical and chemical biology.– Moscow, 1987.– 404 p.
5. Pokudin N.I., Petrunyaka V.V., Orlov S.N. Does calmodulin participate in the regulation of Ca-pump activity in erythrocytes *in vivo* // Biokhimiya.– 1988.– Vol.53, N5.– P. 753-758.
6. Rybina V.V., Elenskaya I.A., Kajmachnikov N.P. Regulation of activity of Ca^{2+} -ATPase by Ca^{2+} ions and calmodulin in human erythrocytes at different storage time // Biol. Membrany.– 2001.– Vol.18, N4.– P. 287-293.
7. Boni L.T., Stewart T.P., Alderfer J.L., Nui S.W. Lipid-polyethylen glycol interaction: II Formation of defects in bilayers // J. Membrane Biol.– 1981.– Vol.62, N1-2.– P. 71-77.
8. Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme // FASEB J.– 1994.– N8.– P. 993-1002.
9. Haynes D.H. Mechanism of Ca^{2+} transport by Ca, Mg-ATPase pump: analysis of major state and pathways // Amer. J. Physiol.– 1983.– Vol.244.– P. G3-G12.
10. Morgan C.G., Thomas E.W., Yianni Y.P. The use of fluorescence energy transfer to distinguish between polyethylene glycol induced aggregation and fusion of phospholipid vesicle // BBA.– 1983.– Vol.782, N3.– P. 356-362
11. Rathbum 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
12. Schatzmann H.J. The red cell calcium pump // Ann. Rev. Physiol.– 1983.– Vol.45.– P. 303-312.
13. Wojcieszyn J.W., Schlegel R.A., Lumley-Sapans I.K. et al. Studies on the mechanism of polyethylene glycol – mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes // J. Cell. Biol.– 1983.– Vol.96, N1.– P. 151-159.

Accepted in 29.10.2003