

# Активность $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов человека в условиях гипертонии при различных температурах

М.В. ХОМЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Activity of $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of Human Erythrocytes Under Hypothermia at Different Temperatures

M.V. KHOMENKO

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

Изменение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках при стрессовых ситуациях может иметь решающее значение для их выживания. В эритроцитах человека  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза является единственным механизмом регуляции внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . В процессе подготовки клеток к низкотемпературному хранению резко изменяются физико-химические свойства среды. Поэтому целесообразно исследовать модификацию активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в гипертонических условиях (с использованием растворов ПЭО-1500, сахарозы и KCl) при различных температурах. Для этого применяли модель реконструированных эритроцитов, которая отображает действие данных веществ на функцию фермента.

При нормотермии ( $37^\circ\text{C}$ ) ПЭО-1500 вызывает ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса в клетках, что связано с комплексным действием этого осмолита на мембранные структуры и макромолекулы. Предположительно, образуется "мантия" вокруг клетки, состоящая из молекул ПЭО, и изменяются свойства воды в ее пределах. Кроме того, возможно встраивание полимера в структуру липидного бислоя, что может вызвать значительные изменения в механизме функционирования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы под воздействием данного соединения. Сахароза влияет на фермент концентрационно-зависимым образом – в диапазоне 100-300 мМ она оказывает стимулирующий эффект на каталитическую активность фермента, а при нарастании концентрации активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы снижается. Этот эффект может быть связан с модификацией свойств мембранного микроокружения  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса и изменением подвижности молекул воды в растворе, что, по-видимому, влияет на стабильность (или нестабильность) отдельных конформационных состояний фермента и, в конечном итоге, – на константы скоростей отдельных реакций каталитического цикла. Воздействие KCl как электролитного соединения принципиально отличается от ПЭО-1500 и сахарозы. Гипертонические растворы умеренно высоких концентраций электролита активируют  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу плазматических мембран эритроцитов. Возможно механизм этого феномена обусловлен действием ионной силы растворов на внутридоменные воздействия в молекуле фермента и возмущением структуры липидной фазы мембран при повышении концентрации солей. При гипотермии ( $5^\circ\text{C}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза нечувствительна к эффектам гипертонических растворов, поскольку ее активность при этой температуре снижена.

Полученные результаты позволяют заключить, что активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов при нормотермии может контролироваться изменением химического состава среды, а при гипотермии фермент становится невосприимчивым к этим изменениям.

Change in  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration in cells under stress may be of decisive value for their survival. In human erythrocytes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is the only mechanism responsible for regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . When preparing cells to low temperature storage there is an abrupt alteration in physical and chemical properties of a medium. Therefore it is expedient to study the modification of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity under hypertonic conditions (using the solutions of PEO-1500, sucrose and KCl) under different temperatures. For this aim there was used the model of reconstituted erythrocytes, completely reflecting the action of physical factors on enzyme function.

At normothermia ( $37^\circ\text{C}$ ) PEO-1500 inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -pump in cells, that related to complex effect of this osmolyte on membrane structures and macromolecules. Probably there is formed a kind of "mantle", consisting of PEO molecules around a cell and water properties change within its limits. In addition, there is possible building-in of polymer into structure of lipid bilayer, that may cause significant changes in functioning mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase under the effect of this compound. Sucrose affects enzyme in a concentration-dependent way, within the range of 100-300 mM it renders stimulating effect on catalytic activity of enzyme and during ascending of concentration the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity decreases.

This effect may be related to modification of properties of membrane microenvironment of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump and with the change in mobility of water molecules in solution that probably affects the stability (or instability) of certain conformational states of enzyme and finally does the constants of rates of separate reactions of catalytic cycle. KCl effect as electrolyte compound differs strongly from PEO-1500 and sucrose. Hypertonic solutions of moderately high concentrations of electrolyte activate  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of erythrocyte plasma membranes. Mechanism of this phenomenon is likely stipulated by the influence of solution ionic strength on intra-domain effects in enzyme molecule and structure excitation of membrane lipid phase at a rise in salt concentrations. During hypothermia ( $5^\circ\text{C}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is not sensitive to the effects of hypertonic solutions, since its activity at this temperature is reduced.

Obtained results enable the concluding that activity of erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase at normothermia may be controlled by the change in chemical composition of the medium and during hypothermia enzyme becomes insusceptible to these alterations.