

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ МЕМБРАН САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

А.Г.Геворкян

*/Институт биохимии им. Г.Бунятыана НАН РА/
375014 Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: панкреатит, миокард, Ca^{2+} -связывающие белки

Ионы кальция играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Передача нервного импульса, мышечное сокращение, коагуляция крови, формирование костного скелета и зубов, а также многие другие физиологические и биохимические процессы не могут протекать без участия Ca^{2+} . Другая не менее важная биологическая роль кальция заключается в признании его как "вторичного мессенджера" в регуляции клеточного цикла гормонами, факторами роста и другими агонистами, как например, стимулирование фосфоинозитидного цикла. Концентрация свободного Ca^{2+} находится в зависимости от интенсивности работы Ca^{2+} -зависимых процессов. Восстановление уровня свободного Ca^{2+} до базальной концентрации зависит от количества высвобожденного Ca^{2+} из клетки и ресеквестрирования Ca^{2+} внутриклеточными органеллами [5]. Однако не менее важное место в деятельности клеток занимают Ca^{2+} -связывающие белки. Следует подчеркнуть важное место Ca^{2+} -связывающих мембранных белков саркоплазматического ретикулума при повреждении миокарда [4].

Материал и методы

Эксперименты проводились на 36 беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г. Животные были разделены на группы: интактные, крысы с экспериментальным панкреатитом (ЭП). ЭП вызывали охлаждением селезеночного сегмента поджелудочной железы хлорэтилом. За 18–24 ч до воспроизведения ЭП животные получали только воду. Режим предварительного голодания был принят для стандартизации условий опыта и синхронизации секреторного цикла в экзокринных панкреоцитах с накоплением в их цитоплазме гранул зимогена. После срединной лапаротомии через операционную рану выводили селезеночный сегмент поджелудочной железы и охлаждали его хлорэтилом, затем железу от-

таивали и помещали в брюшную полость, а операционную рану послойно ушивали наглухо [2]. Животных забивали декапитацией через 3, 24 и 72 ч после повреждения железы [3]. Сродство ионов Са к мембранному белку саркоплазматического ретикулума (СР) с молекулярной массой 32 кДа определяли в координатах Скетчарда [по 1,6] с использованием метода специфического связывания радиоактивного лиганда $^{45}\text{Ca}^{++}$ в условиях *in vitro*. Очищенный белок с м. м. 32 кДа получали путем колоночной хроматографии на сефадексе G-75. После инкубации очищенной фракции белка с $^{45}\text{CaCl}_2$ удельной активностью $1.4 \cdot 10^4$ Ки/моль в количестве 0.1 мкКи $^{45}\text{Ca}^{++}$ на пробу в 0.2 М трис-малеатном буфере (рН 7.2) в течение 45 мин, реакцию останавливали добавлением ледяного 10% ТХУ. Через 10–15 мин после добавления ТХУ пробу фильтровали на фильтрах миллипор типа НА 0.45, промывали тем же раствором, высушивали и измеряли уровень радиоактивности Ca^{2+} на сцинтилляционном спектрометре SL – 4221 (Roche – Bioelectronique Kontron, Франция) с применением жидкого сцинтиллятора "Тритозол" на основе толуола. По специальной компьютерной программе просчитывалось специфическое связывание радиоактивного лиганда. Данные с коэффициентом корреляции менее 92% не учитывались. Просчитывалось максимальное связывание лиганда (B_{max}) и константа диссоциации лиганд белкового комплекса (K_d). Путем изофокусировки на амфолине измерялась изоэлектрическая точка белка в норме и на разных стадиях развития ЭП. Количество белка с м. м. 32 кДа в мембранах СР измеряли денситометрически при 740 нм после электрофоретического разделения тотальной фракции мембранных белков на 10% ПААГ по методу Лемли. Сродство белка с м. м. 32 кДа с ионами ^{45}Ca определяли *in vivo* путем внутрибрюшинного введения 500 мкКи $^{45}\text{CaCl}_2$ за 1 ч до забоя. После декапитации получали фракцию мембран СР путем центрифугирования гомогената в 0,44 М сахарозе+1 мМ ЭДТА [9]. После фракционирования мембранных белков на 10% ПААГ проводили определение уровня связывания $^{45}\text{Ca}^{++}$ на газопоточном счетчике Berthold II (ФРГ). Статистическую достоверность вычисляли при помощи t-теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано [4], что при изопротереноловом повреждении миокарда резко меняется сродство мембранных белков СР к ионам Са. Параллельно с этим была выявлена высокая аффинность мембранного белка СР с м. м. 32 кДа к ионам Са. В дальнейшем этот феномен был вновь зарегистрирован при изучении экспериментального острого панкреатита. Течение ЭП складывается из следующих стадий: отечной — через 5 мин после охлаждения железы, геморрагической (1–6 ч), некротической (12–72 ч), репаративной (после 72 ч) и хронической рецидивирующей (21 сут. и далее). Диагностическим тестом развития ЭП служит определение активности панкреатической ферментемии в крови. Особое

место в этом тесте занимает определение активности α -амилазы, которая через 3 ч после повреждения железы повышается в 7–10 раз. Развитие деструктивного панкреатита сопровождается выработкой ишемизированным панкреасом миокард-депрессорирующего фактора (МДФ), представляющего собой октапептид, количество которого нарастает параллельно увеличению активности сывороточной амилазы [7]. Деструктивные панкреатиты зачастую приводят к летальному исходу в первые 24–48 ч заболевания.

Как при изопротереноловом повреждении миокарда [4], так и при остром ЭП [2] мы имеем одинаковую картину изменения сродства ионов Ca^{2+} к мембранному белку СР с м. м. 32 кДа, который у интактных животных резистентен к Ca^{2+} .

Как показано на рисунке, в норме аффинность к ионам Ca^{2+} проявляют кальсеквестрин (55 кДа), Ca^{2+} -АТФаза (100 кДа) и пять кислых белков. С первых часов развития панкреатита начинает резко снижаться сродство кальсеквестрина к ионам Ca^{2+} , которое в норме составляет 700–900 нмоль на мг белка [8], к концу некротической стадии развития ЭП сродство полностью исчезает. Неизменным остается аффинность только Ca^{2+} -АТФазы и частично одного из пяти кислых белков (рис., г). С развитием ЭП усиливается сродство к Ca^{2+} у белка с м. м. 32 кДа (рис., б, в, г).

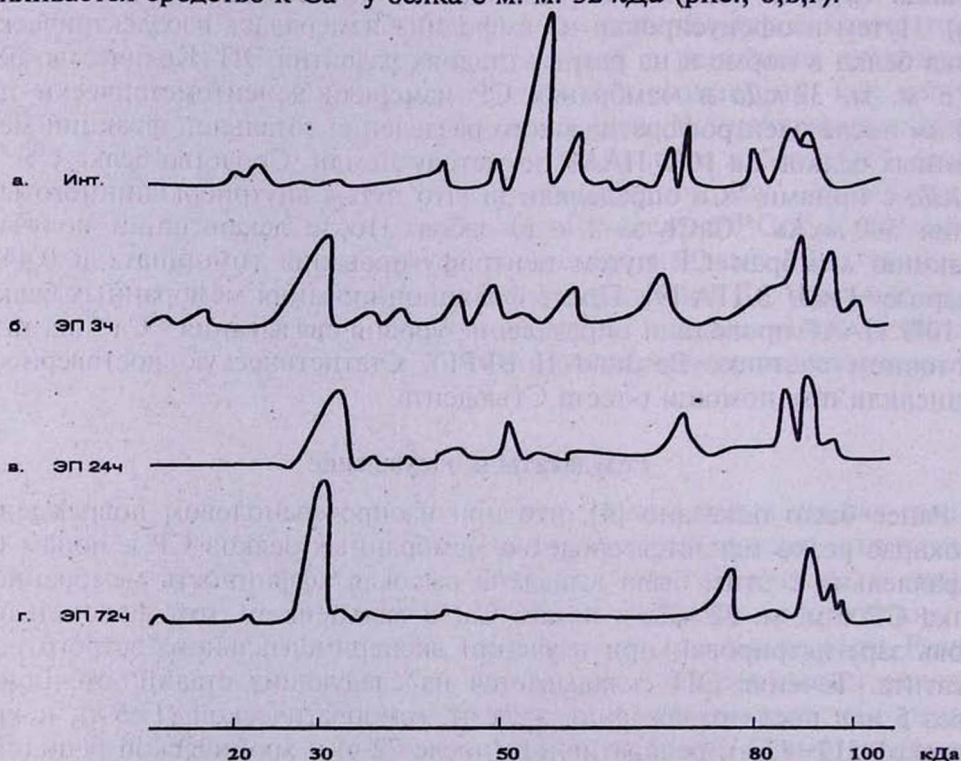


Рис. Связывающие $^{45}\text{Ca}^{++}$ с мембранными белками саркоплазматического ретикулума при экспериментальном панкреатите. Радиофореграмма на 10% ПААГ.

С целью изучения сродства ионов Са и мембранного белка 32 кДа была произведена его очистка из тотальной фракции мембранных белков СР в геморрагической и некротической стадиях развития ЭП. В условиях *in vitro* на очищенном белке была изучена специфичность связывания ионов Са в координатах Скэтчарда [1,6]. Было показано, что связывание ионов Са происходит в двух участках — с высоким и низким сродством. Так, по ходу развития патологии в участке с низкой аффинностью к ионам Са практически не меняется величина максимального связывания (V_{max}) Ca^{2+} и составляет в среднем $45,1 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (табл. 1). Высокоаффинный участок связывания ионов Са увеличивает свое максимальное связывание Ca^{2+} с $225,0 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка в геморрагической стадии развития панкреатита до $305,0 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (35,5%) в начале некротической стадии и продолжает нарастать до $349,0 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (55,1%) в конце некротической стадии развития ЭП. Итак, при изучении максимального количества связавшегося Ca^{2+} к низкоаффинному участку белка не наблюдалось достоверного изменения во всех изученных стадиях развития ЭП. Высокоаффинный участок достоверно увеличивает сродство белка к Ca^{2+} по ходу развития патологии.

В отношении параметров константы диссоциации (K_d) получены следующие сдвиги: низкоаффинный участок в геморрагической стадии панкреатита продолжает удерживать Ca^{2+} в количестве $2,75 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка в процессе диссоциации белок-кальциевого комплекса, которое увеличивается до $3,25 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (18,2%) в начале стадии некроза поджелудочной железы и продолжает нарастать до $4,32 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (57,1%) после завершения развития некроза. Участок высокоаффинного связывания Ca^{2+} имеет следующие значения K_d — $9,5 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка через 3 ч, $12,3 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (увеличение составляет 29,5%) через 24 ч и $16,2 \text{ нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка (70,5%) через 72 ч развития ЭП (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика низкоаффинного и высокоаффинного участков Ca^{2+} -связывающего белка с м.м. 32 кДа из мембран саркоплазматического ретикулума при остром экспериментальном панкреатите (n=6)

Сроки развития патологии	Величина максимального связывания $\text{нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка		Константа диссоциации $\text{нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка		Коэффициент корреляции, %
	Низкоаффинный участок	Высокоаффинный участок	Низкоаффинный участок	Высокоаффинный участок	
3 ч	$42,52 \pm 1,96$	$225,0 \pm 15,6$	$2,75 \pm 0,09$	$9,50 \pm 0,11$	92
24 ч	$45,71 \pm 2,13$	$305,0 \pm 18,9$	$3,25 \pm 0,17$	$12,30 \pm 0,14$	92
72 ч	$47,08 \pm 2,45$	$349,0 \pm 19,7$	$4,32 \pm 0,18$	$16,20 \pm 0,19$	92

Следующим этапом исследования белка с м. м. 32 кДа было изучение изменения его количества во фракции мембран СР. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что количество белка в составе общего белкового спектра практически не изменяется при развитии патологии.

Не менее интересным представлялось исследование изоэлектрической точки. В результате изоэлектрической фокусировки на фармалитах 5–8 рН и 6,5–9 рН были получены следующие значения изоэлектрической точки белка: у интактных крыс рН 8,1, через 3 ч развития ЭП – рН 6,5, через 24 ч – рН 6,5 и через 72 ч – рН 6,2. Следовательно, по ходу развития ЭП мембранный белок СР с м. м. 32 кДа изменяет свою кислотность до слабокислой (табл. 2).

Итак, обобщая экспериментальный материал можно заключить, что при развитии острого ЭП происходят значительные изменения в спектре Ca^{2+} -связывающих белков, локализованных в мембране СР. Такой важный белок как кальсеквестрин (м. м. 55 кДа) практически полностью теряет аффинность к ионам Са несмотря на то, что его абсолютное количество в тотальной фракции белков увеличивается до 24,9%. Следовательно, имеет место не уменьшение количества белка и связанное с этим исчезновение аффинности, а серьезные конформационные изменения. Единственный белок, который даже при уменьшении своего количества на 11% не теряет свою аффинность, – это Ca^{2+} -АТФаза.

Таблица 2

Сдвиги в содержании белка с м.м. 32 кДа в тотальной фракции мембран СР и его изоэлектрической точки при остром экспериментальном панкреатите (n=6)

Сроки	Количество белка мкг/мг общего белка ⁻¹	Изоэлектрическая точка (рН)
Инт.	34,6±2,21	8,1
3 ч	29,6±1,95 $p<0,005$	6,5
24 ч	30,2±2,09 $p<0,005$	6,5
72 ч	31,8±2,17 $p<0,005$	6,2

Примечание. р – достоверность между интактной группой животных и с острым панкреатитом

Нелинейный характер графика Скэтчарда указывает на наличие двух точек связывания лиганда ($^{45}\text{Ca}^{++}$) с белком (32 кДа).

Изменение изоэлектрической точки белка с м. м. 32 кДа на две единицы рН в кислую сторону и приобретение вместе с тем аффинности к ионам Са является, по всей вероятности, компенсаторной реакцией миокарда, направленной на удержание Ca^{2+} в составе мембран СР.

Вызванное патологией изменение аффинности Ca^{2+} -связывающих белков, безусловно, должно активизировать эндогенные механизмы, направленные на компенсирование утраченных свойств. Изменение изоэлектрической точки белка можно объяснить конформационными изменениями структуры белка и/или модификацией — изменением его аминокислотного состава и др. факторами. Известно, что гидрофильные группы аминокислот, находясь на поверхности белка, обуславливают его кислотность. Если изоточка белка с м. м. 32 кДа смещается в кислую сторону, то, по всей вероятности, происходит или раскрытие структуры белка и вскрытие новых кислых аминокислот, сидящих в глубине молекулы, либо (что более вероятно) модификация щелочных аминокислот на кислые. Можно предположить, что пространственное удобное расположение карбоксильных групп на белковой поверхности придает белку кислотные свойства и делает возможным связывание Ca^{2+} .

Поступила 15.03.98

**ԵՆԹԱՏԱՄԱՌՔԱՅԻՆ ԳԵՂԺԻ ԱԽՏԱՀԱՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ
ՍԱՐԿՈՊԼԱՉՄԱՏԻԿ ՌԵՏԻԿՈՒԼՈՒՄԻ ԹԱԿԱՆԹԻՑ ԱՆՉԱՏՎԱԾ
ՆՈՐ Ca^{2+} -ԽՆԱՄԱԿՑՈՂ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ**

Ա.Գ.Գևորգյան

Ենթաստամոքսային գեղձի ախտահարման սուր շրջանը (3, 24, 72 ժ) ուղեկցվում է սրտամկանի նեկրոտիկ վնասվածքով, որը պայմանավորված է գեղձի կողմից սրտամկանը ճնշող գործոնի արտադրությամբ: Ուսումնասիրվել է ախտահարման ժամանակ տեղի ունեցող սարկոպլազմատիկ ռետիկուլումի քաղանքային սպիտակուցի (32 կԴա) խնամակցությունը Ca^{2+} նկատմամբ, որը լիովին բացակայում է ինտակտ կենդանիների մոտ: Թաղանթային մաքուր սպիտակուցի վրա տարվել են հետազոտություններ, որոնց նպատակն է որոշել Ca^{2+} խնամակցությունը: Սկետչարդի եղանակով տարված ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին սպիտակուցի մոլեկուլի վրա երկու կետերի առկայությունը՝ ցածր և բարձր խնամակցության: Ցույց է տրվել, որ ուսումնասիրված ժամանակահատվածում փոփոխվում է այդ սպիտակուցի իզոէլեկտրիկ կետը՝ հաղորդելով սպիտակուցին թթվային բնույթ (8,1-ից մինչև 6,2 pH): Ախտահարման ուսումնասիրված ժամանակահատվածում մեծանում է բարձր խնամակցության կետի կողմից Ca^{2+} կապման արժեքը, բողմելով անփոփոխ ցածր խնամակցության կետի պարամետրերը:

CHARACTERISTICS OF THE NEW Ca^{2+} -BINDING PROTEIN OBTAINED
FROM SARCOPLASMIC RETICULUM IN ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS

A.G.Guevorkian

In the acute stage of development of pancreatitis the Ca^{2+} -binding properties of 32 kDa protein from sarcoplasmic reticulum membrane were studied by Scatchard plots. Low affinity point does not change the level of Ca^{2+} -binding during development of pancreatitis (from 3 till 24 hrs). High affinity point of Ca^{2+} -binding increases on 55,1% the level of the specific bound of $^{45}\text{Ca}^{++}$. The isoelectric points change pH to 8,1 in intact animals, and to 6,5–6,5–6,2 respectively after 3, 24 and 72 hours of experimental acute pancreatitis development.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М., 1982.
2. Геворкян Г.А., Галоян А.А., Канаян А.С. и др. Нейрохимия, 1996, 13, 2, с. 83.
3. Канаян А.С., Пермяков Н.К. и др. Арх. патол., 1984, 4, с. 67.
4. Galoyan A.A., Kevorkian G.A., Voskanian L.O. et al. Neurochem. Res., 1988, 13, 5, p. 493.
5. Heizmann C.W. Novel calcium-binding proteins. Springer-Verlag, 1991.
6. Klotz Irving M. Science, 1982, 217, p. 1247.
7. Leter A.M., Barenholz J. Amer. J. Physiol., 1972, 223, 5, p. 1103.
8. MacLennan D.H. J. Biol. Chem., 1974, 249, p. 980.
9. Meissner G., Conner G.E., Fleischer S. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 298, p. 246.