

УДК 577.112+577.349

Характеристика Ca^{2+} -связывающих мембранных белков саркоплазматического ретикулума при экспериментальном синдроме длительного раздавливания

**А. Г. Геворкян, Л. Г. Мелконян, Р. Л. Айрапетян,
Г. А. Геворкян**

*Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: краш синдром, миокард, кальций

Синдром Биватерса, переименованный впоследствии в *краш синдром*, или *синдром длительного раздавливания* (СДР), впервые был описан в 1941 году в научном журнале ВМЖ после так называемого «лондонского блица» – авиационной бомбежки столицы [1]. СДР характеризуется как нарушение реперфузии в результате травматического повреждения скелетных мышц и развития острого некроза. Острое некротическое повреждение скелетных мышц развивается по мере продолжения компрессии мягких тканей. Впоследствии СДР был описан более подробно после природных катаклизмов, техногенных аварий, войн и террористических акций. Критериями диагностирования СДР являются раздавливание большой массы скелетных мышц, сенсорные и моторные расстройства конечностей с последующим опуханием, миоглобинурия и наличие крови в моче (гематурия), повышение активности креатинкиназы (более 1000 ед/л), почечные расстройства в виде олигурии (диурез менее 400 мл/сутки), повышение уровня мочевины в крови, сывороточного креатинина, креатинкиназы (КФК, >1000 ед/л), мочевой кислоты, K^+ , PO_4 , снижение Ca^{2+} и др. Согласно информационному бюллетеню «PatientPlus», опубликованному в 2004 г. в Англии для врачей службы медицины катастроф, при землетрясениях более 5% населения зоны бедствия подвержены СДР, у 50% раздавленных под обломками людей развивается острая почечная недостаточность. Характерными особенностями развития патогенеза СДР являются нарушение электролитного состава, вовлечение системы NO. Отмечена NO-зависимая вазодилатация капилляров в поврежденной мышце, что и является первопричиной обострения гиповолемического шока [4-6]. На ранних стадиях развития патогенеза СДР иммунный ответ проявляется в виде кратковременного резкого возрастания активности

изоформ NO-синтазы в нейтрофилах через 2 ч декомпрессии, которая впоследствии снижается как в нейтрофилах, так и в остальных иммунокомпетентных клетках крови, тимуса и селезенки после 24 ч декомпрессии.

Гиперкалиемиа является одной из основных причин развития сердечно-сосудистой недостаточности с летальным исходом в первые дни высвобождения организма из-под компрессии. Физиологически нормальная концентрация ионов калия в клетке находится в пределах примерно 90 мэкв/л, а в плазме его концентрация доходит до 4 мэкв/л. После компрессии мышцы, в период декомпрессии, концентрация калия в плазме возрастает, что и становится причиной остановки сердца. Разрушение мышечного миоглобина и его проникновение в почки приводит к нарушению почечной системы и началу выработки токсических продуктов пептидной природы в ишемизированных почках. Высвобождаясь в кровяное русло, эти токсины распространяются по всему организму и приводят к развитию общей интоксикации. Токсины в виде небольших пептидов, присоединяя к своему N-концу аминокислоту аргинин, в виде так называемых *аргининобелков* начинают продвигаться по периферической нервной системе и, проникая через гемато-энцефалический барьер, доходят до мозга. Делаются попытки к обобщению имеющихся материалов по СДР для использования результатов экспериментального исследования в практической медицине.

Материал и методы

Исследования проводились на беспородных белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе.

Модель экспериментального СДР создавали путем раздавливания бедренной мышцы на специальном прессе с силой давления $100 \text{ кг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы животного, продолжительностью 5 часов. Животные были разделены на следующие группы: интактная, контрольная – компрессия в течение 5 ч и опытная – 2, 4, 24 и 48 ч декомпрессии.

Выделение саркоплазматического ретикулума проводили после перфузии сердца 0,15М раствором KCl и методом дифференциального центрифугирования в среде 0,44М сахарозы и 1мМ ЭДТА при среде $\text{pH}=7,4$. Сродство Ca^{2+} к мембранным белкам СР определяли в координатах Скотчарда с использованием радиоактивного лиганда – $^{45}\text{Ca}^{++}$ с удельной радиоактивностью $1,4 \cdot 10^4$ Кюри·моль $^{-1}$. Изучение белкового спектра мембран СР было проведено путем фракционирования белков по молекулярной массе методом электрофоретического разделения на 10% ПААГ с содержанием натрия додецилсульфата по методу Вебера и Осборна [7].

По специально разработанной программе просчитывали специфическое связывание радиоактивного лиганда (данные с коэффициентом корреляции менее 92% не учитывались), величину максимального связывания $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (B_{max}) и константу диссоциации белок-лигандного комплекса (K_d). Методом изофокусировки на амфолине измерялась изоэлектрическая точка белка в норме, при компрессии и различных периодах декомпрессии.

Результаты и обсуждение

Схожесть идентичного протекания сдвигов в аффинности мембранных белков СР в отношении Ca^{2+} , при изопротереноловом повреждении миокарда и при экспериментальном остром панкреатите (ОП) побудила нас к поиску еще одной модели, при которой повреждается миокард. Нами была разработана модель *синдрома длительного сдавливания*, которая как и ОП отличается общей интоксикацией организма и выбросом в кровяное русло разнородных токсических пептидов, вызывающих повреждение организма.

Нами ранее было показано [2, 3], что как при изопротереноловом повреждении миокарда, так и повреждении миокарда при ОП выявлено идентичное перераспределение Ca^{2+} в кардиомиоцитах, а также сходная аффинность мембранных белков СР к Ca^{2+} . Причем аффинность к Ca^{2+} одинаково меняется как в отношении пяти кислых белков, Ca^{2+} -АТФазы и кальсеквестрина в составе мембран СР, так и в отношении нового Ca^{2+} -связывающего белка с м.м. 32 кДа, проявляющего свою аффинность к белку при патологии. У интактных животных этот белок не проявляет аффинности к Ca^{2+} . У этих животных количество белка с м.м. 32 кДа в общем спектре мембранных белков СР составляет 90,1 мкг на 1 мг белка. Через 5 ч компрессии его количество не меняется. В период 2, 4, 24 и 48 ч декомпрессии сдвиги в содержании этого белка статистически недостоверны. Анализируя полученные результаты, мы рассчитали сдвиги в изменении аффинности к Ca^{2+} мембранных белков СР (рис.).

Как видно из рисунка, компрессия в течение 5 ч вызывает недостоверные сдвиги в отношении аффинности Ca^{2+} к мембранным белкам СР. Так, основной Ca^{2+} -связывающий белок – кальсеквестрин (м.м. 55 кДа) не претерпевает изменений в аффинности к Ca^{2+} . Недостоверно изменяются аффинности остальных Ca^{2+} -связывающих белков (рис., б). Через 2 ч после компрессии начинает вырисовываться четкая картина снижения величины аффинности мембранных белков СР к Ca^{2+} и параллельно мембранный белок с м.м. 32 кДа начинает проявлять аффинность к Ca^{2+} (рис., в), которая идентично сохраняется и после 4 ч декомпрессии (рис., г). Декомпрессия в течение 24 и 48 ч приводит к резкому изменению сродства к Ca^{2+} (рис., д). В этот период

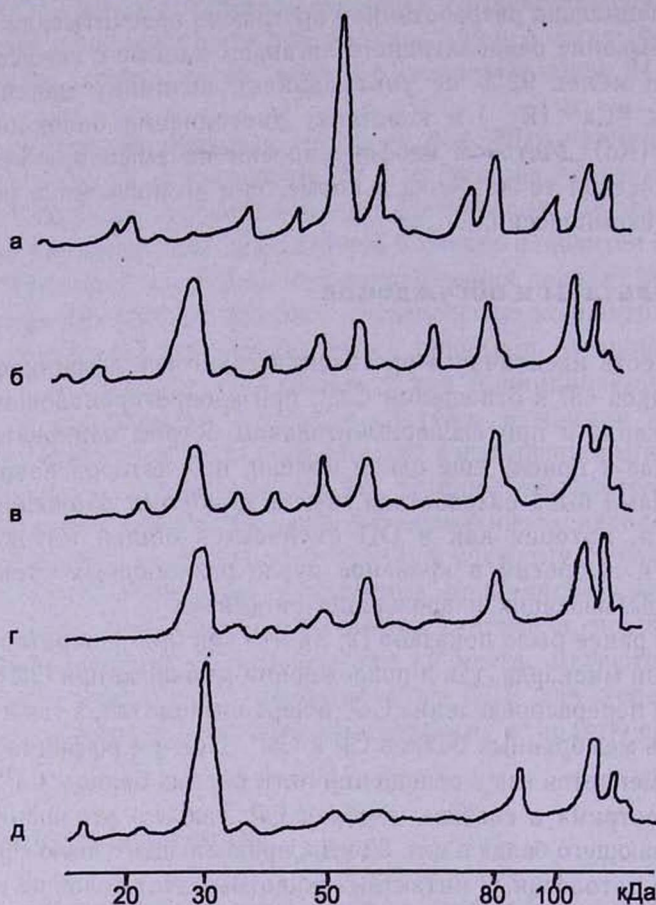


Рис. Сродство ионов радиоактивного $^{45}\text{Ca}^{++}$ к мембранным белкам саркоплазматического ретикулула после фракционирования на 10% ПААГ: а-интактные животные; б-декомпрессия в течение 2 ч; в-4 ч; г-24 ч; д-48 ч

лишь Ca^{2+} -АТФаза сохраняет аффинность примерно на 65-70% от интактного уровня, а остальные белки – 5 кислых мембранных белков и кальсеквестрин полностью теряют аффинность к Ca^{2+} (рис., д). Параллельно с утерей Ca^{2+} -связывающих способностей вышеперечисленных белков начинает возрастать аффинность мембранного белка с м.м. 32 кДа к Ca^{2+} , а через 24 и 48 ч декомпрессии количество связавшегося Ca^{2+} приравнивается к уровню связывания кальсеквестрина у интактных животных.

Исследование аффинности мембранного белка к Ca^{2+} в координатах Скетчарда выявило два центра связывания Ca^{2+} – с высоким и низким сродством (табл. 1). Достоверность полученных результатов представлена из расчета коэффициента корреляции равного 92%, что является максимально достоверным для данного метода исследования.

Таблица 1

Параметры сродства Ca^{2+} с мембранным белком СР с м. м. 32 кДа, рассчитанные в координатах Скетчарда

Сроки развития патологии	Величины максимального связывания $\text{Нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка		Константа диссоциации $\text{нМ} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка		Коэффициент корреляции, %
	низко-аффинный участок	высоко-аффинный участок	низко-аффинный участок	высоко-аффинный участок	
Контроль	45,62±0,86	231,58±9,51	2,92±0,08	8,71±0,06	92
2 ч после компрессии	38,42±0,15	201,24±8,06	3,25±0,05	11,27±0,09	92
4 ч после компрессии	47,63±0,21	245,43±9,92	4,58±0,07	13,28±0,11	92
24 ч после компрессии	42,63±0,63	234,88±7,83	4,99±0,09	15,15±0,24	92
48 ч после компрессии	43,22±0,41	258,91±8,82	5,63±1,01	17,18±0,38	92

Величина максимального связывания Ca^{2+} в низкоаффинном участке у контрольных животных (компрессия 5 ч) не отличается от интактного уровня. Через 2 ч после компрессии эта величина снижается на 15,8%, увеличивается через 4 ч декомпрессии – на 24% по сравнению с 2 ч, снижается через 24 ч (10,5%) и на 9,3% по сравнению с 4 ч декомпрессией. Величина максимального связывания высокоаффинного участка претерпевает следующие изменения: результаты контрольных животных изменяются недостоверно по сравнению с интактной группой. Через 2 ч декомпрессии она снижается на 13,2%, повышается, как и в низкоаффинном участке, на 21,9% через 4 ч декомпрессии, снижается на 9% через 24 ч и повышается на 28,7% через 48 ч декомпрессии.

Константа диссоциации рецептор-лигандного комплекса (мембранный белок СР с м.м. 32 кДа - Ca^{2+}), указывающая величину связавшегося Ca^{2+} в любой отрезок времени, меняется как в низкоаффинном, так и высокоаффинном участках, сохраняя линейную характеристику. Эта величина одинаково возрастает как в низкоаффинном, так и высокоаффинном участках соответственно на 93% и 97%.

Очищенный мембранный белок с м.м. 32 кДа был изучен на предмет исследования изоэлектрической точки в разные периоды декомпрессии. Полученные результаты показали, что при изоэлектрической изофокусировки на формалитах 5-8 рН и 6,5-9 рН мембранный белок из СР меняет свою реакцию кислотности с 8,3 в контрольной группе до 5,9 в группе животных после 48 ч декомпрессии. Изменение рН носит линейный характер (табл. 2).

Изменение рН в кислую сторону на 2,4 единицы параллельно с

Таблица 2

Сдвиги в содержании белка с м. м. 32 кДа в тотальной фракции мембран СР и его изоэлектрической точки при синдроме длительного раздавливания (n = 7)

Группа животных	Количество белка мкг · мг общего белка ⁻¹	Изоэлектрическая точка (pH)
Интактная	34,6±1,85	8,2
5 ч компрессии	31,3±2,21	8,1
2 ч декомпрессии	28,3±2,13 p<0,05	6,9
4 ч декомпрессии	30,5±1,98 p<0,05	7,1
24 ч декомпрессии	31,4±2,92 p<0,05	6,5
48 ч декомпрессии	30,4±2,19 p<0,05	5,8

выраженной аффинностью к Ca^{2+} указывает на глубокие изменения физико-химических свойств этого белка в процессе декомпрессии. Приобретение сродства к Ca^{2+} , по всей вероятности, является компенсаторной реакцией со стороны организма, направленной на удержание Ca^{2+} , без которого невозможно представить сократительную способность миокарда. Полученные нами ранее результаты по перераспределению Ca^{2+} в кардиомиоцитах при изопротереноловом повреждении миокарда, ОП, а также по схожести аффинности мембранных белков СР к Ca^{2+} дают нам право экстраполировать результаты вышеприведенных двух патологий на патогенез СДР.

Изменение изоэлектрической точки в кислую сторону, а также изучение аминокислотного состава мембранного белка СР с м.м. 32 кДа указывают на увеличение в составе белка кислых аминокислот — глутаминовой и аспарагиновой. Надо полагать, что при включении в состав белка одной карбоксильной группы, вторая “выглядывает” из структуры белка, это и позволяет двум кислым аминокислотам, находясь на расстоянии, образовать валентную связь с двухвалентным кальцием, соединять и удерживать Ca^{2+} .

Поступила 27.08.08

Սարկոպլազմատիկ ռետիկուլումի Ca^{2+} -կապող թաղանթային սպիտակուցների բնութագիրը երկարատև ճգման համախտանիշի ժամանակ

Ա.Գ. Գևորգյան, Լ.Գ. Մելքոնյան, Հ.Լ. Հայրապետյան, Գ.Ա. Գևորգյան

Երկարատև ճգման համախտանիշով փորձարարական կենդանիների վրա ուսումնասիրվել է կալցիումի իոնների խնամակցությունը սրտամկանի սարկոպլազմատիկ ռետիկուլումի թաղանթների սպիտակուցների վրա:

Պարզվել է, որ ետճգման ժամանակահատվածում փոփոխվում են կալցիում կապող սպիտակուցների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները, որի հետևանքով կալսեքվեստրինը և հինգ թթվային սպիտակուցները կորցնում են խնամակցությունը կալցիում իոնների նկատմամբ: Թաղանթային 32 կԴա կշիռ ունեցող սպիտակուցը, ընդհակառակը, ձեռք է բերում խնամակցություն կալցիումի նկատմամբ, թեև նրա քանակը թաղանթային սպիտակուցների ընդհանուր սպեկտրում չի փոփոխվում: Ինտակտ կենդանիների մոտ այն հանդիսանում է հիմնային սպիտակուց (pH 8,2), որը ետճգման ժամանակահատվածում դրսևորում է թթվային հատկություններ, որով էլ բացատրվում է կալցիումի նկատմամբ խնամակցության աճը:

Characteristics of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -binding membrane proteins at the crush syndrome

A.G. Gevorgyan, L.G. Melkonyan, H.L. Hayrapetyan, G.A. Kevorkyan

We have studied the Ca ion affinity on the membrane proteins of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum at a prolonged crush syndrome on experimental animals.

We have determined that during the decompression period the physical and chemical properties of Ca-binding proteins change, as a result of which the calsequestrine and five acid proteins lose their affinity on Ca ions. On the other hand, the protein with 32kDa membrane affinity acquires affinity on Ca, though its quantity in common protein spectrum remains unchanged. In intact animals it is alkaline protein (pH 8,2), which acquires acidic features at decompression period, which explains the growth of its affinity to Ca.

Литература

1. *Biwaters E. G. L., Beal D.* Crush injuries with impairment of renal function, *British Med. J.*, 1941, 1, p. 427-439.
2. *Kevorkian G.A., Marukhyan G.L., Arakelyan L.N., Guevorkian A.G., Galoyan A.A.* Influence of the hypothalamic proline rich peptide on the level of ^{14}C -Glucose utilization during crush syndrome, *Neurochem. Res.*, 2001, 26, 7, p. 827-830.
3. *Kevorkian G.A., Voskanyan L.H., Muradyan M.Sh., Galoyan A.A.* Neurohormonal regulation of Ca^{2+} -binding properties in cardiomyocytes at the acute pancreatitis, *Neurochemical Res.*, 1988, 13, p. 816-822.
4. *Kumar S.M., Porterfield D.M., Muller K.J., Smith P.J.S., Sahley C.L.* Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor, *J. Neurosci.*, 2001, 1, 21, p. 215-220.
5. *Kuzis K., Coffin J. D., Eckenstein F. P.* Time course and age dependence of motor neuron death following facial nerve crush injury: role of fibroblast growth factor, *Exp. Neurol.*, 1999, 157, 1, p. 77-78.
6. *Rubinstein I., Abassi Z., Coleman R., Milman F., Winaver J., Better O.S.* Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury, *J. Clin. Invest.*, 1998, 101, 6, p. 1325-1333.
7. *Weber K., Osborn N.* The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-poliacrilamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, 1969, 244 (16), p. 4406-4412.