

УДК 577.115

**Нарушения сродства мембранных белков
саркоплазматического ретикулума с ионами
кальция при синдроме длительного раздавливания
у белых крыс**

А.М. Микаелян

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

Ключевые слова: радиолиганд, метод Скетчарда, синдром длительного раздавливания, острый панкреатит

Синдром Биватерса, переименованный впоследствии в *краш синдром*, или *синдром длительного раздавливания* (СДР), впервые был описан в 1941 году в научном журнале BMJ после так называемого *лондонского блица* – авиационной бомбежки столицы [3]. Впоследствии СДР был описан более подробно после природных катаклизмов, техногенных аварий, войн и террористических акций [5,8,13]. Критериями диагностирования СДР являются раздавливание большой массы скелетных мышц, сенсорные и моторные расстройства конечностей с последующим опуханием, миоглобинурия и гематурия, повышение активности креатинкиназы (более 1000 Ед/л), почечные расстройства в виде олигурии (диуреза менее 400 мл/сутки), повышение уровня мочевины в крови, сывороточного креатинина, креатинкиназы (КФК >1000 Ед/л), мочевой кислоты, K^+ , PO_4 , снижение Ca^{++} и др. («PatientPlus», 2004). 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. Пострадавшие нуждаются в немедленном диализе с подключением к аппарату искусственной почки, что невозможно было осуществить при землетрясении в Спитаке по техническим причинам, поскольку количество нуждающихся в диализе было несколько тысяч, а для приостановления развития патогенеза СДР необходим режим непрерывного подсоединения к аппарату диализа не менее 2–2,5 месяцев. 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 [13]. Гиперкалиемия является одним из основных причин развития сердечно-сосудистой недостаточности, заканчивающейся летальным исходом в первые дни высвобождения организма из-под компрессии. 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 периферийной нервной системе и, проникая через гематоэнцефалический барьер, доходят до мозга. Показано развитие нейродегенеративного поражения ткани мозга на фоне развития патогенеза СДР [5,7,9,10,16]. Делаются попытки к обобщению имеющихся материалов по СДР для использования результатов экспериментального исследования в практической медицине.

Открытый академиком А. Галояном гипоталамический цитокин – *пролином богатый полипептид* (ПБП) был охарактеризован как C-терминальный фрагмент нейрофизина-II, состоящий из 15 аминокислотных остатков и содержащий четыре остатка пролина, обладающего высокой биологической активностью при активации иммунной системы организма [4]. Обнаружено свойство ПБП индуцировать дифференцирование и пролиферацию Т-клеток, активирующих продукцию интерлейкина 2.

Материал и методы

Экспериментальная модель СДР и острого панкреатита (ОП) воспроизводилась на белых беспородных крысах линии Вистар массой 210-230 г [6].

Фракции митохондрий (М) и саркоплазматического ретикулума (СР) получали методом дифференциального центрифугирования в среде 0,44М сахарозы с 1мМ ЭДТА.

Фракционный состав мембранных белков СР получали методом гель-электрофореза на 10% ПААГ в присутствии Na-DDS. Для количественного определения отдельных фракций, проводили сканирование полиакриламидной пластины при 540 нМ. Фракционный состав пептидов определяли методом Эдмановской деградации пептида, который состоит во взаимодействии N-концевой аминокислоты с фенилизотиоцианатом в щелочной среде. При дальнейшей обработке слабой кислотой без нагревания происходит отщепление от цепи меченой концевой аминокислоты в виде фенилгидантоинового (ФГТ) производного [2]. Изоэлектрофокусировку проводили на градиентном геле в присутствии амфолинов с градиентным рН.

Величину специфического связывания радиолиганда с мембранными белками СР и М определяли по Скетчарду [15] в модификации Guevorkyan A.G. [6]. Белок определяли по Лоури [12]. Статистическую обработку проводили по one-way ANOVA.

Результаты и обсуждение

При длительном раздавливании бедренной мышцы белых крыс (100кг/1кг массы животного) имеет место разрушение мышечного белка – миоглобина (состоит из 154 аминокислотных остатков) и образование многочисленных фрагментов пептидной природы. Среди этих фрагментов миоглобина нами были идентифицированы 4 пептида, обнаруженные впоследствии в сердце и головном мозге. Была определена также аминокислотная последовательность этих фрагментов.

Структура миоглобина

1-60

Met.Gly.Leu.Ser.Asp.Gly.Glu.Trp.Gln.Leu.Val.Leu.Asn.Val.Trp.Gly.Lys.
Val.Glu.Ala.Asp.Ile.Pro.**Gly.His.Gly.Gln.Glu.Val.Leu.Ile.Arg**.Leu.Phe.
Lys.
Gly.His.Pro.Glu.Thr.Leu.Glu.Lys.Phe.Asp.**Lys.Phe.Lys.His**.Leu.Lys.Ser.
.Glu.Asp.Glu.Met.Lys.Ala.Ser.Glu.

61-120

Asp.Leu.Lys.Lis.His.Gly.Ala.Thr.Val.Leu.Thr.Ala.Leu.Gly.Gly.Ile.Leu.Lys.
Lys.Lys.Gly.His.His.Glu.Ala.Glu.Ile.Lys.Pro.Leu.Ala.Gln.Ser.His.Ala.
Thr.
Lys.His.Lys.Ile.Pro.Val.Lys.Tyr.Leu.Glu.Phe.Ile.Ser.Glu.Cys.Ile.Ile.Gln.
Val.Leu.Gln.Ser.Lys.His.

121-154

Pro.Gli.Asp.Phe.Gly.Ala.Asp.Ala.Gln.Gly.Ala.Met.Asn.Lys.Ala.Leu.Glu.
Leu.Phe.**Arg.Lys.Asp.Met.Ala**.Ser.Asn.Tyr.Lys.Glu.Leu.Gly.Phe.
Gln.Gly.

В результате разрушения миоглобина, при СДР, выявлены 4 пептида токсической природы, проявляющие разрушительное действие в мозгу и почках. Структура этих пептидов состоит из 9, 7, 5 и 4 аминокислотных остатков.

1. Gly.His.Gly.Gln.Glu.Val.Leu.Ile.Arg. – 9 аминокислотных остатка;
2. Lys.Lys.Gly.His.His.Glu.Ala. – 7 аминокислотных остатка;
3. Arg.Lys.Asp.Met.Ala. – 5 аминокислотных остатка;
4. Lys.Phe.Lys.His. – 4 аминокислотных остатка.

Миокард депрессирующий фактор – октапептид, открытый А. Леффером в 1973 году, обладающий некрозогенным свойством и вызывающий инфаркт миокарда в первые 72 часа после развития панкреонекроза, по

аминокислотному составу повторяет пептид, состоящий из 9 аминокислот и выявленный при СДР. Однако октапептид при ОП от нанопептида отличается N-терминальным аргинином при СДР, который помогает ему проникнуть в мозг по механизму *feed back*, позволяющему проходить через гематоэнцефалический барьер в мозг.

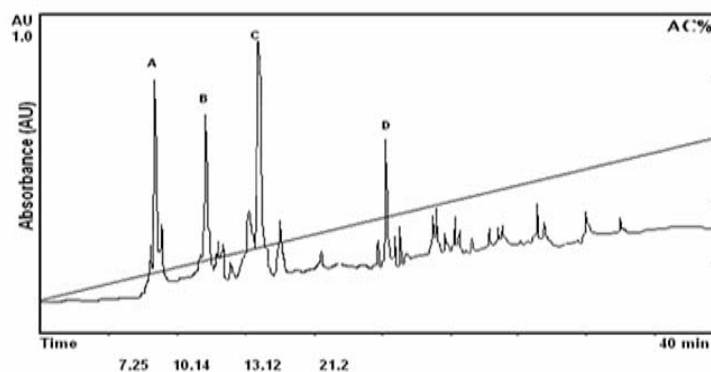


Рис. 1. Разделение нанопептида проводили в условиях градиента на колонке Agilent C18 (250x3,0 mm). Элюация проводилась средой ацетонитрил/вода 0,1% ТФА в условиях линейного градиента со скоростью 1мл/1 мин. Продолжительность составляла 40 мин, измерение при 210 нм. Данные указывают на гомогенность без содержания низкомолекулярных соединений

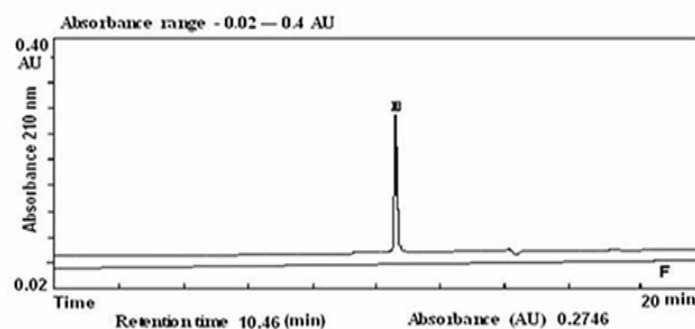


Рис. 2. Рехроматография нанопептида на колонке Biosphere Si-100 C18 (250x4,6 мм)

Таким образом, в эксперименте использован очищенный нанопептид, что указывает на зарегистрированные изменения исключительно под воздействием нанопептида.

Морфологическое изучение структуры поврежденного миокарда показало характерную картину инфаркта миокарда, диффузно распространенного по всей поверхности (рис. 1).

Фрагментом широко развернутых исследований миокарда явилось изучение транслокации Ca^{2+} в М и СР, а также сродство ионов кальция с мембранными белками М и СР.

Для сцинтилляционных спектрометров с целью проведения исследований по изучению сродства ионов кальция с мембранным белком была разработана программа для расчета специфического связывания радиолиганда (в нашем случае – $^{45}\text{Ca}^{++}$) с рецепторами (мембранными белками) по методу Скетчарда [1].

Исследование белкового спектра мембран СР на предмет сродства с ионами кальция выявило, что в посткомпрессионном периоде, после 2 ч компрессии, Са-связывающие 5 кислых белков и кальсеквестрин (55кДа) значительно снижают степень сродства с ионами кальция [6]. Идентичная картина снижения спектра связывания ионов Са мембранными белками СР прослеживается как при ОП, так и при СДР. Потеря сродства ионов кальция, связанных с мембранными белками СР, и снижение его концентрации в СР может вызвать отрицательный эффект для этих органелл. Уменьшение концентрации ионов кальция ниже $<300 \text{ нМ}$ вызывает процесс текучести мембран, когда содержание кальция снижается и СР перестают выполнять возложенные на эти органеллы функции. Однако система самосохранения СР для поддержания целостности и функции органелл включает адаптационный механизм, который переводит утерянные свойства кальсеквестрина (о.м.м. 55 кДа) на мембранный белок СР с о.м.м. 32 кДа, не проявляющий сродства с Ca^{2+} у интактных крыс (рис. 2). При этом с ростом отрицательного влияния СРД на миокард при увеличении периода декомпрессии, усиливается сродство данного белка с ионами кальция. Абсолютно одинаковые сдвиги в аффинности мембранных белков СР с ионами кальция наблюдаются как при СДР, так и при ОП [11,14]. Полученные результаты находятся в пределах статистической достоверности.

Для идентификации подобных сдвигов были изучены количественные сдвиги кальсеквестрина и белка с о.м.м. 32 кДа мембраны СР. Оказалось, что количество этих двух белковых фракций по ходу развития патогенеза при СДР и ОП отличается статистически недостоверно – в пределах 10-12%. Проведение изофокусировки пептида с о.м.м. 32 кДа в среде с амфолинами показало, что нативный пептид имеет щелочную природу с $\text{pH } 8,0-8,2$. По мере развития патогенеза СДР в посткомпрессионном периоде пептид начинает приобретать кислый характер, а через 72 часа декомпрессии его кислотность составляет $\text{pH } 6,8-6,9$. Изучение аминокислотного состава пептида показало, что на 14-16% возрастает количество моноаминодикарбоновых кислот – глутаминовой и аспарагиновой. Встраиваясь в структуру пептида одной карбоксильной группой, вторая остается для связывания 2-валентного кальция. Исследования этого пептида в отдаленном периоде декомпрессии (до 21-го дня) показали, что

аминокислотный состав, а следовательно, и сродство с ионами кальция постепенно приближаются к интактной картине. Несомненно, что изначально в миокарде заложен мощный адаптационный механизм, позволяющий сердцу выдержать столь глубокие нарушения свойств мембранных белков СР как при ОП, так и при СДР.

Таблица

Количественное содержание отдельных фракций в составе белков мембран саркоплазматического ретикулула

Мг кДа	Интактные	Некроз при ОП	Некроз при СДР	Некроз при ОП+ПБП	Некроз при СДР+ПБП
100	50,2±4,2	44,8±3,4	47,3±4,2	49,2±3,9	48,3±5,4
80	62,9±3,5	59,7±2,9	54,5±3,1	60,1±5,1	56,8±4,7
65	88,6±5,4	89,5±6,8	85,1±4,9	74,9±6,7	86,5±5,5
55	50,2±4,1	62,6±4,9	52,3±3,8	54,3±3,9	52,6±2,9
32	34,6±2,7	31,2±2,2	33,4±2,6	32,7±2,8	32,1±1,9
20	25,8±2,3	29,4±2,3	26,8±1,9	29,6±2,7	26,5±2,2

Примечание. Данные выражены в мкг·мг белка⁻¹ тотальной фракции. В лунку 10% ПААГ нанесено 150 мкг белка; M±m, n=6

Независимо от сроков развития патогенеза ОП или посткомпрессионного периода после СДР, количество мембранных белков СР меняется незначительно, в пределах 7-9% (таблица). Сопоставляя результаты количественного спектра белковых фракций с афинностью тех же белков по отношению к ионам кальция, можно сделать заключение об изменении аминокислотного состава фракции белков, что и приводит к приобретению новых свойств для усиления сродства ионов кальция с мембранными белками. Об этом факте свидетельствуют результаты изоэлектрической фокусировки в градиенте амфолинов, указывающие на приобретение кислотных свойств по мере развития патогенеза как при ОП, так и при СДР. Следует еще раз подчеркнуть идентичность, по аминокислотному составу, октапептида при ОП и декапептида при СДР с отличием 9-й аминокислоты – аргинина при СДР.

Таким образом, разрушение молекулы миоглобина в посткомпрессионном периоде приводит к образованию многочисленных фрагментов пептидной природы, 4 из которых были нами исследованы более подробно. Доказана роль нанопептида в повреждении миокарда вплоть до картины инфаркта миокарда. В процессе патогенеза СДР кардинально

меняется картина аффинности мембранных белков СР к ионам кальция. Впервые нами показано появление сродства белка с о.м.м. 32 кДа в результате изменения физико-химических свойств данного белка, проявляющегося в изменении аминокислотного состава с увеличением количества дикарбоновых аминокислот в структуре пептида, за счет которых и наблюдается проявление кальций-связывающих свойств с включением кальция в структуры нонапептида. По всей вероятности, новое качество белка в составе мембран СР играет защитную роль и предохраняет мембраны от разрушения и развития процесса текучести мембран. Идентичная картина прослеживается также при ОП. Идентичность октапептида при остром панкреатите с нанопептидом при синдроме длительного раздавливания свидетельствует об идентичности миокард депрессирующих факторов при этих патологиях. Доказано мембраностабилизирующее действие ПБП на миокард, а также его положительное влияние на восстановление миокарда.

Поступила 20.12.16

**Սարկոպլազմատիկ ռետիկուլումի խնամակցության
խանգարումը կալցիումի իոնների նկատմամբ երկարատև
ճգման համախտանիշի ժամանակ սպիտակ առնետների մոտ**

Հ.Մ. Միքայելյան

Սարկոպլազմատիկ ռետիկուլումի թաղանթի սպիտակուցային սպեկտրի ուսումնասիրությունը՝ կալցիումի խնամակցության առումով, ցույց տվեց, որ հետճգման շրջանում՝ 2 ժամ ճգումից հետո Ca-կապող 5 թթու սպիտակուցները և կալսեկվեստրինը էականորեն նվազեցնում են կալցիումի իոնների հետ խնամակցության աստիճանը: Նմանատիպ պատկեր, երբ նվազում է կալցիումի իոնների և սարկոպլազմատիկ ռետիկուլումի (ՄՌ) թաղանթային սպիտակուցների խնամակցության սպեկտրը, նկատվում է ինչպես սուր պանկրեատիտի, այնպես էլ երկարատև ճգման համախտանիշի ժամանակ: Կալցիումի իոնների և ՄՌ թաղանթային սպիտակուցների խնամակցության կորուստը և դրա նվազեցումը ՄՌ-ում կարող է բացասաբար ազդել այդ օրգանելների վրա: Ախտահարման ժամանակ Ca իոնների խնամակցության ֆունկցիան կոմպենսացնում է 32 կԴա թաղանթային սպիտակուցը, այդպիսով պաշտպանելով սրտամկանը վնասվածքներից:

The impairments of affinity of membrane proteins of sarcoplasmic reticulum to the calcium ions in case of long-term crush syndrome in white rats

H. M. Mikayelyan

The research of membrane protein spectrum of sarcoplasmic reticulum (SR) on the subject of affinity to the ions of calcium revealed that in the post-compression period after 2 hours of compression the Ca-binding 5 acidic proteins and the calsequestrin notably reduce the level of affinity to the ions of calcium. The identic picture of reducing the spectrum of binding the ions of Ca with the SR membrane proteins is observed in case of acute pancreatitis as well as in case of long-term crush syndrome. The loss of calcium ions binding with the SR membrane proteins and the reduction of its concentration in the SR can cause a negative effect on these organelles. In case of pathology of the ion-binding function, Ca compensates the membrane protein 32 kDa, preventing disturbance of myocardium.

Литература

1. *Микаелян А.М., Геворкян А.Г., Геворкян Г.А.* Разработка компьютерной программы для изучения связывания радиолиганда в биологических структурах по методу Скетчарда. Мед. наука Армении НАН РА, 2016, т. LVI, 4, с. 64-69.
2. *Овчинников Ю. А.*, Биоорганическая химия. М., 1987.
3. *Bivaters E.G.L. & Beal D.* Crush injuries with impairment of renal function. British Med. J., 1941, 1, p. 427-439.
4. *Galoyan A.A.* In: Biochemistry of novel cardioactive hormones and immunomodulators of the functional system neurosecretory hypothalamus-endocrine heart. Nauka Publ., Moscow, 1997.
5. *Gillen C., Jander S., Stoll G.* Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system comparison between immune-mediated rat dorsal root ganglia, spinal cord, and gracile nuclei following cut or crush syndrome. Exp. Neurol., 1998, vol. 126, 1, p. 224-230.
6. *Guevorkyan A.G., Alchujyan N. Kh., Mikayelyan H.M. et al.* Beneficial effects of hypothalamic proline-rich peptide-1 on the heart failure associated with experimental pancreatic necrosis and crush syndrome. Eur. Chem. Bull., 2016, 5(6), p. 259-265.
7. *Kevorkian G.A., Kanayan A.S., Guevorkian A.G., Hayrapetyan H.L., Galoyan A.A.* Protein synthesis changes in brain subcellular particles during the crush syndrome. The influence of hypothalamic cytokine proline-rich peptide (PRP). Biochemistry, 2005.
8. *Kevorkian G.A., Kanayan A.S., Hayrapetyan H.L., Guevorkian A.G., Galoyan A.A.* The influence of proline-rich peptide (PRP) on cellular structure of peripheral blood during iatrogenic aplastic anemia. Eur. J. Biochem., 2004, vol. 271, 1, p. 20-31.
9. *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 ¹⁴C-Glucose utilization during crush syndrome. Neurochem. Res., 2001, vol. 26, p. 7, 827-830.
10. *Kevorkian G. A., Marukhyan G. L., Arakelyan L. N., Guevorkian A. G., Galoyan A. A.* Neurochem. Res., 2001, 26(7), p. 829-832.

11. *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, vol. 157, 1, p. 77-78.
12. *Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.* *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265-75.
13. *Martinez A.M. & Canavarro S.* Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2000 Dec;33(12):1477-82.
14. *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, vol. 101, 6, p. 1325-1333.
15. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1949, 51, p. 660-672.
16. *Walikonis R.S. & Poduslo J.F.* Fast axonal transport of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in cholinergic neurons in the rat sciatic nerve. *Neurochem. Intern.*, 1998, vol. 203, 5, p. 457-467.